

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Thèse présentée par
Christine FERRY

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg
Sciences du Vivant-Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Activité protéolytique et non protéolytique du protéasome
et de ses sous-complexes dans la réponse à l'acide
rétinoïque**

Soutenue publiquement le 16 décembre 2010 devant le jury composé de :

Rapporteur externe : **Dr. Catherine DARGEMONT (IJM, Paris)**
Rapporteur externe : **Pr. Vincent LAUDET (IGFL, Lyon)**
Rapporteur interne : **Dr. Ali HAMICHE (IGBMC, Illkirch)**
Directeur de Thèse : **Dr. Cécile ROCHETTE-EGLY (IGBMC, Illkirch)**

Remerciements

Je remercie l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse, Madame le **Docteur Catherine Dargemont** et Monsieur le **Docteur Vincent Laudet**, en tant que rapporteurs externes, Monsieur le **Docteur Ali Hamiche** en tant que rapporteur interne.

Je tiens à remercier le **Docteur Cécile Rochette-Egly** de m'avoir accueillie en DEA dans son équipe et de m'avoir offert la chance d'y réaliser ma thèse. Son enthousiasme sans faille, son soutien et sa disponibilité ont été d'une grande aide durant mon apprentissage de la Recherche. Mes étourderies n'ont pas eu raison de sa patience bien au contraire! C'est avec un certain regret que je continuerai mon chemin tant la dynamique de l'équipe, la thématique et le cadre de travail étaient stimulants.

Tout d'abord, je tiens à remercier les correcteurs : Eric, Sébastien, Agathi, Nathalie, Céline et Samia à l'affût de la moindre coquille, qui ont comblé mes lacunes en orthographe et qui m'ont bien aidé dans la dernière ligne droite ...

A présent, passons à mes amiES et amiS IGBMC-ins... Mes premiers remerciements vont tout naturellement à "attention attention tout le monde sur la piste pour une ovation à....**Sébastien!**". Durant presque 4 ans, nous avons formé un sacré binôme, les « VIP bonheur », còpain-còpine, Dom'heu...bref... Merci pour ton aide scientifique (ou non), ton écoute et ton soutien quand la barque était dans les creux de la thèse, on a bien ramé ensemble! La mise au point des macarons, du temps de croustade et leur dégustation a été longue et laborieuse mais nous nous en sommes brillamment sortis ! Maintenant que tout est plus calme, chacun sur son radeau continue sa navigation mais cette période restera un très agréable souvenir rempli de bons délires, de belles anecdotes et d'une solide complicité...d'ailleurs as-tu vu ce papier pile poil sur mon sujet, SUG-1, SRC-3... ???

Ma thèse a également été le théâtre de belles rencontres. Merci **Nathalie** pour ton accueil dans cette troupe pour mon DEA et pour toute la disponibilité dont tu as fait preuve. Bien que ta mission de me faire aimer les chats et d'essayer de moins blasphémer ait échoué tu m'as néanmoins convaincue (entre autres) de l'utilité de la « phosphorescence » dans la guerre des étoiles...

Eric, tel Greg et son couteau, Thomas et son micro, le Londonien et sa béquille, j'ai trouvé en toi mon acolyte de fou-rires, blagues, cours de pipeau et de marionnettes... mais toujours sur un fond de Recherche, de Science, de rigueur et d'efficacité! J'espère de mon côté t'avoir enseigné tous mes petits trucs expérimentaux (transfert au PBS, blocage dans 5% lait, etc...) afin que la relève soit assurée, enfin au moins jusqu'à Thanksgiving...

Je souhaite également remercier **Vanessa** pour sa douceur, son oreille attentive, ses petits regards en coin et surtout, surtout, pour sa patience mise assez souvent à rude épreuve... Notre entente ne fut pas au début une évidence mais elle s'est imposée et m'a beaucoup aidée dans notre travail de fourmi. Maintenant que nous allons avoir un peu de temps pour nous que dirais-tu d'aller à Ibiza faire un petit « ciao » à Kathy et David ? Je pourrai t'aider à faire tes valises pour ne pas oublier de vêtements, mais si tu sais ton petit haut là...mais si...avec le flot !

Non, non, non **Samia** je ne t'oublie pas! Un immense Merci pour ton aide, ton punch, ton professionnalisme, ton optimisme à toutes épreuves et pour la bouffée d'air frais que tu as apporté dans l'équipe ! Travailler avec toi et réviser ma trigonométrie autour d'un verre de Zup a été très stimulant et très agréable! J'espère t'avoir transmis ma passion des IP, des IF et du massicot....

Gaétan, nous ne nous sommes pas croisés très longtemps mais tu es resté pour moi un modèle d'efficacité, de rigueur et de connaissance! Tout cela avec en toile de fond, ta gentillesse, ta

disponibilité et surtout ta passion des drôles (?) de jeux de mots. D'ailleurs tu as trois poussins sur une table et tu en veux deux. Tu fais quoi ? Ben, t'en pousses un!

Merci à **Régis** et **Aleksandr** qui ont bien voulu être les testeurs de mes expériences culinaires plus ou moins réussies... Merci aux derniers arrivés dans l'équipe **Gabriela** et **Ziad** pour avoir supporté mes excès de stress dans cette dernière ligne droite.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à l'équipe de la plateforme de séquençage haut débit et particulièrement à **Benoit** et à **Amélie**, notre collaboration pour le criblage a été très enrichissante et des plus plaisantes. J'ai beaucoup apprécié nos discussions, surtout celles de certains vendredis après midi ! De la même façon, merci à **Adeline** et **Franck** pour leur aide, leurs conseils et leur disponibilité dans mon projet « SM », enfin spectrométrie de masse. De même, merci à **Marcel** pour son aide en imagerie et pour les belles photos et les montages!

Oyé Oyé, Merci à **Jean-Marie Garnier**, grand Empereur du clonage et à son acolyte **Pascal**. Ce fut toujours un plaisir de venir chercher les clonages, l'ampicilline ou d'autres peptides dans votre château ! Que votre règne dure et prospère le plus longtemps possible ! Longue vie à l'Empereur !!!

A présent dans la grande famille IGBMC je demande **Tata Claudine** et **Tata Cécé** ! Votre aide, les discussions sur nos espoirs et désillusions ont été des plus distrayantes et/ou réconfortantes. D'ailleurs Claudine, à quand notre fameuse balade à cheval et Céline notre prochaine visite chez Séphora? Je tiens également à remercier mes voisines et voisin (passé(es) et présentes) de culture cell', **Michèle**, **Flo** (championne du 100m), **Emilie V.**, **Manu**, **Shankar** et mes conseillères culinaires **Catherine** et **Cathie**. Merci également à **Emilie C.** pour nos diverses virées et concerts, **Sarah** pour toutes les petites discussions et bons moments londoniens.

Je souhaite aussi remercier David et Nicolas, mes deux critiques culinaires, très indulgents du 4^{ème} nord. Merci **Davad** d'avoir débusqué la fameuse recette secrète des natas, de m'avoir fait découvrir le trajet Metz-Strasbourg par la nationale et surtout merci d'avoir pris soin de moi. Nos longues discussions et ton soutien m'ont beaucoup aidé.

Nico, ton aide au labo, nos discussions sur les papillons bleus, les apéros et notre pari sont d'autant de petits détails qui ont égayé ma thèse.

Merci à **Aurélien** d'avoir abrégé mes souffrances lombaires pendant ma rédaction par le lège de ton fauteuil! Et vivement l'hiver, que tu remettes ton fameux pull!

Merci également à **Pascaline Ullmann** et aux autres moniteurs des TP "techniques biologiques". Les TP ont été un vrai plaisir ! Je re-signe de suite si c'est possible !

Un grand merci aux perles de l'institut, **Eveline**, **Maïté** et **Josiane** pour votre gentillesse et votre disponibilité de chaque instant.

Merci à **Elise F.** pour nos très bonnes soirées "test de resto", à défaut d'un post-doc on pourrait se lancer dans l'édition d'un guide culinaire de Strasbourg, non?

Maintenant, au tour des non-IGBMC-in! Merci **Gaël** pour ton oreille attentive, tes mails du vendredi (surtout un très précieux pour les jours de doute), ton soutien et les belles années d'amitié derrière et devant nous! De la même façon **Côpine**, je te remercie pour ton aide, ton écoute et tout le réconfort que tu m'as apporté ainsi que pour les excellents w-e passés ensemble! La fac est à présent plutôt loin derrière nous, mais **Baronne** je ne t'oublie pas et c'est encore avec beaucoup de plaisir et énormément de nostalgie que je repense aux cours et TP où nous savions très souvent qui allait passer au tableau...

Je n'oublie pas non plus les **Quercussiens** de souche ou d'adoption, avec qui il est toujours très agréable d'user les bancs et tabourets de l'Irish! Avec une pensée particulière pour **Christo** le

P'tit Homme chevelu, **Delphine** ma "Partenaire" de pâtisserie, **Laetitia** aussi infectée par le virus "colo" et **Nico**, grand critique littéraire. Un grand merci à **Scott**, ma hotline Illustrator!

Je tiens également à remercier les personnes venues de contrées lointaines pour m'apporter leur soutien et partager ce moment important. **Ounissa**, j'en profite pour te remercier pour tes encouragements et ton enthousiasme permanent! **Elsa**, avec qui la maîtrise de la respiration et de la détente est devenue un art dans l'animation et mon petit **Marc**, incollable sur les fuseaux horaires.

Enfin, merci à toutes les personnes qui de près ou de loin ont participé à cette "aventure" et à celles que j'oublie dans la précipitation, mais qui, j'en suis sûre, m'excuserons pour cet impair!

Pour finir je remercie ma famille pour leur soutien. Merci à ma sœur **Elise**, mes **Oncles**, **Tantes**, **Cousines**, mes **Grands-mères** et particulièrement à **mes Parents** qui m'ont toujours soutenue, encouragée et réconfortée quand cela était nécessaire. Merci pour votre confiance, votre écoute, votre disponibilité, ... pour tout en fait!

Pour terminer je souhaite dédier ce travail à mes **Parents**, ma **Mamie Lina** et à la mémoire de **Mamie Buzule** et de **La Lola**.

Publications

1. **Ferry,C.***, Gianni,M.*, Lalevée,S., Bruck,N., Plassat,JL., Raska,IJr., Garattini,E., and Rochette-Egly,C. (2009)
SUG-1 plays proteolytic and non-proteolytic roles in the control of RA-target genes via its interaction with SRC-3
J. Biol. Chem. 284 (12), 8127-8135
2. Bruck,N., Vitoux,D., **Ferry,C.**, Bauer,A., de Thé,H., and Rochette-Egly,C. (2009)
A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RAR α to target promoters
EMBO J. 28(1):34-47
3. **Ferry, C.**, Gaouar,S., Fischer,B., Boeglin,F., Brino,L. and Rochette-Egly,C.
Cullin 3 mediates SRC-3 ubiquitination and degradation to control the retinoic acid response
Manuscrit en préparation
4. **Ferry,C.***, Lalevée,S.*, and Rochette-Egly,C. (2009)
Phosphorylation control of nuclear receptors
Methods in Molecular Biology : Transcription Factors : Methods and Protocols
Editor P. Higgins Humana Press, a part of Springer Science+ Business media

* Co-premiers auteurs

Figures

Figure 1 : Isomères de l'acide rétinoïque	29
Figure 2 : Organisation modulaire des RAR.....	30
Figure 3 : Organisation et structure tridimensionnelle du DBD des RAR/RXR.....	32
Figure 4 : Les différents types de RARE	33
Figure 5 : Structure tridimensionnelle du LBD	34
Figure 6 : Structure tridimensionnelle de l'hétérodimère RAR/RXR fixé à l'ADN	37
Figure 7 : Structure tridimensionnelle du LBD et changements structuraux après fixation du ligand .	37
Figure 8 : Conformations du NTD	39
Figure 9 : Modèle classique d'activation des gènes cibles de l'AR.....	42
Figure 10 : Organisation modulaire des corépresseurs et changements conformationnels du LBD après fixation des corépresseurs.....	43
Figure 11 : Corépresseurs et complexes associés	45
Figure 12 : Changements conformationnels du LBD et interaction avec les coactivateurs.....	46
Figure 13 : Coactivateurs et protéines associées	47
Figure 14 : Corépresseurs à motifs LxxLL et complexes associés.....	50
Figure 15 : Régulation de la traduction des ARNm GluR1 par RAR α	52
Figure 16 : Mode d'action de SRA/Pus1p sur la transactivation des gènes cibles de l'AR	53
Figure 17 : Voies de signalisation et cibles phosphorylées	56
Figure 18 : Activation des voies kinasiques et effets non génomiques de l'AR	57
Figure 19 : Organisation modulaire de SRC-3, sites de phosphorylation et kinases associées.....	64
Figure 20 : Séquence NLS de RAR α	64
Figure 21 : Les effets génomiques et non génomiques convergent pour initier la transcription des gènes cibles de RAR α en réponse à l'AR	66
Figure 22 : Propriétés de SRC-3 régulées par des PTM	69
Figure 23 : Les PTM composent un code conduisant à la dégradation de SRC-3	70
Figure 24 : Modèle d'action du variant SRC-3 Δ 4 en réponse aux EGF.....	74

Figure 25 : Structure d'une et de deux ubiquitines liées covalent.....	76
Figure 26 : Les différentes formes d'ubiquitination	77
Figure 27 : Cycle d'ubiquitination.....	78
Figure 28 : Structure du domaine UBC de l'enzyme E2 UBE2D2.....	79
Figure 29 : Organisation et structure tridimensionnelle des complexes CRL	80
Figure 30 : Séquence et organisation d'un domaine RING.....	81
Figure 31 : Structure tridimensionnelle du domaine HECT de la E3 ligase E6-AP.....	83
Figure 32 : Comparaison des surfaces de dimérisation des E3 Prp19 et BRCA1/BARD1	84
Figure 33 : Structure des complexes impliquant une homo-diubiquitine Lys63.....	87
Figure 34 : Composition du protéasome.....	89
Figure 35 : Structure du complexe 20S CP du protéasome.....	90
Figure 36 : Assemblage du protéasome 20S CP	91
Figure 37 : Dégradation de l'ubiquitine.....	95
Figure 38 : Rôles du protéasome dans la transcription.....	97
Figure 39 : Le protéasome 19S participe à la transcription des gènes sous le contrôle de Gal4.....	98
Figure 40 : Principaux sites de phosphorylation de RAR α et kinases associées.....	107
Figure 41 : Phosphorylation et ponts salins du LBD de RAR α	108
Figure 42 : Promoteurs des gènes Cyp26A1 et RAR β 2.....	109
Figure 43 : Schéma récapitulatif des effets génomiques et non génomiques induits par l'AR.....	110
Figure 44 : Dégradation cyclique de SRC-3 en réponse à l'AR.....	114
Figure 45 : Domaines de SRC-3 et sites cibles de la p38MAPK	116
Figure 46 : La phosphorylation de la sérine 860 est induite par l'AR.....	117
Figure 47 : Modèle d'activation et de dégradation de SRC-3 dans la réponse à l'AR	119
Figure 48 : RAR α est dégradé en réponse à l'AR.....	121
Figure 49 : RAR α est dégradé par le protéasome en réponse à l'AR	122
Figure 50 : Ubiquitination de RAR α	123
Figure 51 : Dégradation de RAR α sauvage et muté au niveau des sérines 77 et 369.....	124

Figure 52 : Ubiquitination de RAR α sauvage ou muté sur les sérines 77 et 369	125
Figure 53 : Dégradation de RAR α délété de l'hélice H12	126
Figure 54 : Domaines et séquences PEST de SRC-3.....	129
Figure 55 : Domaines et séquence PEST de RAR α	134

Tableaux

Tableau 1 : Divergences entre les LBD des RAR	36
Tableau 2 : Domaines et sites de phosphorylation des RAR et kinases associées	62
Tableau 3 : Sites de phosphorylation des RXR et kinases associées	63
Tableau 4 : Phosphorylations de SRC3, kinases et PTM associées.....	68
Tableau 5 : Composition des complexes Culline-RING-Ligase (CRL)	82
Tableau 6 : Composition et activité des sous-unités du sous-complexe régulateur 19S.....	93

Abréviations

19 RP : Regulatory Particle 19S

20 CP : Core Particle 20S

A : Adénosine

A, Ala : Alanine

AAA-ATPasique : ATPases Associated with diverse cellular Activities

ABP : Actin Binding Protein

Abl1 : Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1

AC : Adénylate Cyclase

ACIN1 ou Acinus : Apoptotic Chromatin condensation Inducer in the Nucleus

ACTR : Thyroid hormone and Retinoid Receptor ou SRC-3

AD ou DA : Activation Domain ou domaine d'activation

ADA3 : Alteration/Deficiency in Activation 3

ADN ou DNA : Acide DésoxyriboNucléique ou DesoxyriboNucleic Acid

AF-1, 2 : Activation Function 1, 2

AIB1 : Amplified in Breast cancer ou SRC-3

Akt : protéine kinase B

Ala : Alanine

AMP : Adénosine MonoPhosphate

AndR : Androgen Receptor ou récepteur des androgènes

APC : Anaphase Promoting Complex

aPKC : atypical Protein Kinase C

APIS : AAA Protein Independent of the 20S

AR : Acide Rétinoïque

ARN ou RNA: Acide RiboNucléique ou RiboNucleic Acid

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ARNnc : Acide RiboNucléique non codant

ARNpol II : ARN polymerase II

ASAP : Apoptosis Splicing Associated Protein

ASK1 : Apoptosis Signal-regulating Kinase 1

ATP : Adénosine Tri Phosphate

ATRA : All Trans Retinoic Acid

bHLH-PAS : basic Helix Loop Helix-PerArnt/AhRSim

BLR1 : Burkitt's Lymphoma Receptor 1

BTB : Broad complex, Tramtrack, Bric-a-brac

C : Cytosine

C, Cys : Cystéine

CAK : Cdk Activating Complex

CAMK II γ : Ca²⁺ CalModuline Kinase II gamma

CAR : Constitutive Androstane Receptor

CARM1 : Coactivator Associated aRginine Methyltransferase 1

CART1 : Cytoplasmic Adaptor for RAR and TR

CBP : CREB Binding Protein

Cdk : Cyclin dependant kinase

CHIP : C terminus of Hsc70-Intercating Protein

ChIP : Chromatin ImmunoPrecipitation

ChIP-ChIP : Chromatin ImmunoPrecipitation on *ChIP*

CK1 γ : Casein Kinase gamma

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CoR-NR box : CoRepressor-Nuclear Receptor box

CRABP2 : Cytoplasmic Retinoic Acid Binding Protein 2

CRBP1, 2, 3 : Cellular Retinol Binding Protein 1, 2, 3

CREB : Cyclic AMP Response Element Binding

CRL : Cullin RING Ligase

CtBP : C-terminal Binding Protein

CTD : C-Terminal Domain

CTE : COOH-Terminal Extension

Cul : Culline

CYP26A1 : CYtochrome Protein 26A1

D, Asp : Aspartate

DAD : Deacetylase Activating Domain

DBD : DNA Binding Domain

DDB1 : DNA Damage-Binding protein 1

DR : Direct Repeat

DRIP205/TRAP220 : Vitamin D Receptor Interacting Protein 205

DUB : DeUBiquitylating enzyme

E, Glu : Glutamate

E1 : E1 activating enzyme

E2 : E2 conjugating enzyme

E2 : Oestradiol

E3 : E1 ubiquitin ligase

E6-AP : Human papillomavirus E6-Associated Protein

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

eIF : eukaryotic Initiation Factors

EJC : Exon/exon Junction Complex

ER : Estrogen Receptor

ERK : Extracellular signal Regulated Kinase

ES : Embryonic Stem cell

F, Phe : Phenylalanine

F9 : cellules embryonnaires de carcinome de souris

FAK : Focal Adhesion Kinase

Fbw7 : F-box and WD-40 domain-containing protein 7

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

FXR : Farnesoid X Receptor

G : Guanine

G, Gly : Glycine

GluR : Glutamate Receptor

GPS2 : G Protein Pathway Suppressor 2

GR : Glucocorticoid Receptor

GR1P : Glucocorticoid Receptor Interacting Protein 1

GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3

GST-pulldown : Glutathione S-Transferase – pulldown

GTF : General Transcription Factor **H** : hélice

H : Hélice

H, His : Histidine

HAEC1 : HECT domain and Ankyrin repeat Containing E3 ubiquitin-protein ligase 1

HAT : Histone Acetyl Transferase

HDAC : Histone DesAcetylase

HeLa : cellules épithéliales humaines de cancer cervical

HMT : Histone Methyl Transferase

HNF : Hepatocyte Nuclear Factor

HOX : Homeobox	MRP : Motif Riche en Prolines
HSF2 : Heat Shock Factor protein 2	mSin3 : mammalian Switch independent 3 protein
Hsm3 : enhanced spontaneous mutability	MSK1 : Mitogen and Stress activated protein Kinase 1
IKK : I-kappa-B kinase	N, Asn : Asparagine
I, Ile : Isoleucine	NB4 : lignée cellulaire humaine promyélocytaire
IR-10 : coronin 2A	NCoA : Nuclear receptor CoActivator
IUD : Intrinsically Unstructured Domain	NCoR : Nuclear receptor CoRepressor
JNK : c-Jun N-terminal Kinase	Nedd8 : Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down regulated 8
K, Lys : Lysine	NES : Nuclear Export Signal
kDa : kilo Dalton	NF-κB : Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3
L : Loop ou boucle	NGFIR : Nerve Growth Factor Induced Induced Receptor
L, Leu : Leucine	NID : Nuclear Receptor Interacting Domain
LBD : Ligand Binding Domain	NLS : Nuclear Localization Signal
LBP : Ligand Binding Pocket	NR ou RN : Nuclear Receptor ou Récepteurs Nucléaires
LCoR : Ligand-dependent CoRepressor	NR-box : Nuclear Receptor-box
LRR : Leucin Rich Repeat	NTD : N-Terminal Domain
LXR : Liver X Receptor	NURR1 : NUclear Receptor Related 1
LYL1 : Lymphoblastic Leukemia 1	P : Phosphate
M, Met : Methionine	P, Pro : Proline
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase	P19 : cellules embryonnaires de carcinome de souris
MAT1 : Ménage A Trois 1	p160 : Protéine coactivatrice de 160kDa
MATH : Meprin And TRAF Homology	PAAF1/Rpn14 : Proteasomal ATPase-associated factor 1
MCF-7 : Michigan Cancer Foundation-7, cellules humaines tumorales mammaires	PAC : Proteasome Assembly Chaperone
MDA-MB-231 : cellules humaines tumorales mammaires	PAK : p21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase
MEF : Mouse Embryonic Fibroblast	
Met4 : Methionine-requiring protein 4	
MIR1 : Modulator of Immune Recognition 1	
MKK : Mitogen activated protein Kinase Kinase	
MR : Mineralocorticoid Receptor	

PARC : p53 Cytoplasmique Anchor protein

PAS : Per-Arnt-Slim

pCAF : P300/CBP Associated Factor

PDX1 : Pancreas/Duodenum homeobox protein 1

pCIP : p300/CBP-Interacting Protein

PHD : Plant HomeoDomain

PI3K : Phosphatidylinositol 3 Kinase

PIC : PreInitiation Complex

Pin1 : Peptidyl-Prolyl Isomerase 1

PKA : Protein Kinase A

PKC : Protein Kinase C

PP1, 2a : Protein Phosphatase 1, 2a

PPAR : Peroxisome Proliferator Activated Receptor

PR : Progesterone Receptor

PRAME : PReferentially expressed Antigen in MElanoma

PRMT1 : Protein aRginine MethylTransferase 1

PTM : Post Translational Modification ou Modification Post Traductionnelle

Pusp1p : Pseudo uridyl synthase protein 1p

PXD1 : Pancreas/Duodenum homeobox protein 1

PXR : Pregnane X Receptor

Q, Gln : Glutamine

R, Arg : Arginine

RAC3 : RAs-related C3 botulinum toxin substrate 3 ou SRC-3

RARE : Retinoic Acid Response Element

RAR : Retinoic Acid Receptor

Rbx1, 2 : RING-box protein 1, 2

RD : Repression Domain

Raf : RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase

RING : Really Interesting New Gene

RIP13, 140 : Receptor Interacting Protein 13, 140

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

Rpn : Regulatory particle of non- ATPase

RSK : Ribosomal protein S6 kinase alpha

Rsp5 : Reverses SPT-phenotype protein 5

RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

Rtp1-6 : Regulatory particle of triple ATPase 1-6

RXR : Retinoid acid Receptor X

S.cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*

SAGA : Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase

SANT : Swi3/Ada2/N-CoR/TFIIID

S, Ser : Sérine

SCF : Skp1-Cullin-F-Box

SH3 : Src Homology 3

SHARP : SMRT1/HDAC1-Associated Repressor Protein

siRNA : short interfering RNA

Skp1 : S-phase kinase-associated protein 1

SLIRP : SRA stem-LOOP-Interacting RNA binding Protein

SMRT : Silencing Mediator of Retinoic and Thyroid receptors

SOCS : Suppressor Of Cytokine Signalling

Sp1 : Transcription factor Sp1

SR : Substrate Receptor

SRA : Steroid receptor RNA Activator

Src : v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog

SRC-1, 2 ou 3 : Steroid Receptor Coactivator 1, 2 ou 3

STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3

SUG-1 : Suppressor for Gal1

SUMO : Small Ubiquitin related Modifier

SWI/SNF : SWitching deficient/Sucrose Non Fermenting

T : Thymine

T, Thr : Thréonine

TACC : Transforming Acidic Coiled Coil

TAF : TBP-Associated Factor

TAL1 : T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia 1

TBL1 : Transducin Beta-Like protein 1

TBLR1 : TBL1 Related protein

TBP : TATA Binding Protein

TFIIA, B, D, H : Transcription Factor II A, B, D, H

Tfb2 : RNA polymerase II Transcription factor B subunit 2

TIF1 α , 2 : Transcription Intermediary Factor 1 alpha, 2

TGF- β : Transforming Growth Factor beta

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

TPR : Tetratricopeptide Repeat

TR : Thyroid hormone Receptor

TRAC3 : T3R-associated Cofactor

Ub : ubiquitine

Uba1, 6 : Ubiquitin Activating Enzyme E1

UBA : Ubiquitin-Associated

UBC : Ubiquitin-Conjugating Catalytic

UBD : Ubiquitin Binding Domain

UBL : Ubiquitin like

U-box : UFD2-homology domain

Ump1 : Ubiquitin-mediated proteolysis

UPS : Ubiquitin Proteasome System

UTR : UnTranslated Region

UV : UltraViolet

V, Val : Valine

VDR : Vitamin D Receptor

VHL-box : Von Hippel Lindau box

W, Trp : Tryptophane

WT : Wild Type

WW : tryptophane/tryptophane

X : Acide amine quelconque

XPB : Xeroderma Pigmentosum group B-complementing protein

XPD : Xeroderma pigmentosum group D-complementing protein

Y, Tyr : Tyrosine

Zn : Zinc

Sommaire

Remerciements	3
Publications	7
Figures	9
Tableaux	13
Abréviations.....	15
Sommaire	21
Avant propos	25
Introduction	29
I. Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont des facteurs de transcription inductibles par le ligand	29
A. Le ligand : l'acide rétinoïque.....	29
B. Les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque	29
1. Structure des RAR et des RXR.....	30
a. Le domaine de fixation à l'ADN (DBD)	30
i. Structure du DBD	31
ii. Éléments de réponse (RARE)	33
b. Le domaine de fixation du ligand (LBD)	34
i. Poche de fixation du ligand (LBP)	35
ii. Interface de dimérisation	36
iii. L'hélice H12 C-terminale : changements structuraux suite à la fixation du ligand	37
c. Le domaine N-terminal (NTD)	38
d. La région D	40
e. La région F, C-terminale	41
2. Activité transcriptionnelle des RAR : modèle classique établi pour RAR α	41
a. Répression en absence de ligand	42
b. Activation en réponse à l'AR	45
i. Modèle classique d'activation <i>via</i> le recrutement de corégulateurs	45
ii. Corégulateurs non conventionnels	48
• Corégulateurs dépourvus de motifs LXXLL.....	49
• Corépresseurs à motifs LXXLL	49
3. Association des RAR avec des ARN.....	51
a. Interaction avec des ARNm.....	51

b. Interaction avec des ARN non codants	52
---	----

II. Nouvelles activités des RAR : interférences des RAR et de l'AR avec les voies de signalisation 55

III. Les RAR et leur coactivateur SRC-3 sont des phosphoprotéines 61

A. Sites de phosphorylation des RAR, des RXR et de SRC-3	61
1. RAR	61
2. RXR	62
3. SRC-3	63
B. Rôles de la phosphorylation dans la réponse à l'AR	64
1. Rôles de la phosphorylation des RAR (pour revue Publication 4)	64
a. Localisation intracellulaire des RAR	64
b. Association/dissociation de corégulateurs au niveau du NTD	65
c. Recrutement à l'ADN	65
2. Rôles de la phosphorylation de SRC-3	67
a. Phosphorylation de SRC-3 en réponse à divers stimuli	68
b. Rôles de la phosphorylation de SRC-3 en réponse à l'AR	71
C. Phosphorylation et cancer	71
1. Phosphorylation aberrante des RAR et cancer	71
2. Phosphorylation de SRC-3 et cancer	72

IV. Les RAR et leur coactivateur SRC-3 sont dégradés par le système ubiquitine-protéasome 75

A. Le système ubiquitine-protéasome	75
1. L'ubiquitination	75
a. L'ubiquitine	75
b. Réaction d'ubiquitination : une cascade multi-enzymatique	77
i. E1 : enzyme d'activation de l'ubiquitine	78
ii. E2 : enzyme de conjugaison	78
iii. E3 : Enzyme de reconnaissance	79
• Les RING-E3 ubiquitine ligases	80
• Les HECT-E3 ubiquitine ligases	83
• Les E3 ubiquitine ligases atypiques	84
iv. E4 : facteur d'élongation	84
v. Les déubiquitinases (DUB)	85
c. Rôle double de l'ubiquitine : vers la dégradation ou non	85
i. La monoubiquitination : rôle non protéolytique	85
ii. L'homo-polyubiquitination au niveau de la Lys63 : rôle non protéolytique	86
iii. L'homo-polyubiquitine au niveau de la Lys48 : rôle protéolytique	87
d. Régulation de l'ubiquitination par d'autres modifications post-traductionnelles	88
2. Le protéasome	89

a.	Composition, structure et assemblage	89
i.	20S CP : le sous-complexe catalytique	90
ii.	19S RP : le sous-complexe régulateur	92
iii.	Rôles des modifications post-traductionnelles dans l'assemblage et l'activité du protéasome	94
iv.	Autres complexes associés au 20S CP	94
b.	Rôles protéolytiques	95
i.	Reconnaissance du substrat	95
ii.	Rôles protéolytiques associés à la transcription	96
c.	Rôles non protéolytiques	97
d.	SUG-1 : sur tous les fronts	98
i.	SUG-1 et la protéolyse	98
ii.	SUG-1 et la transcription	99
B.	Dégradation des RAR par le protéasome	99
C.	Dégradation de SRC-3 par le protéasome	100
1.	Phosphorylation, phospho-dégrenon et dégradation de SRC-3	101
2.	Demi-vie de SRC-3 indépendante de la phosphorylation	102
	Objectifs	105
	Résultats	107
	I. Phosphorylation et protéasome : de l'activation à la dégradation	107
A.	Phosphorylation de RAR α : clé de voûte de la transcription des gènes cibles (Publication 2)	107
1.	Effets non génomiques de l'AR et de RAR α	107
2.	RAR α est phosphorylé par MSK1 et cdk7	107
3.	Phosphorylation de RAR α et transcription	108
a.	Recrutement phospho-dépendant de RAR α à l'ADN	108
b.	Phosphorylation des histones H3 par MSK1 : préparation de la chromatine	111
B.	SRC-3 et SUG-1 : deux corégulateurs transcriptionnels de RAR α (Publication 1)	111
1.	SRC-3 et SUG-1 modulent la transcription des gènes cibles	111
2.	<i>In vivo</i> , SRC-3 et SUG-1 interagissent avec RAR α	112
3.	SRC-3 et SUG-1 sont recrutés sur les promoteurs des gènes Cyp26 et RAR β 2	112
C.	SRC-3 est dégradé de façon phospho-dépendante par le système UPS en réponse à l'AR	113
1.	SRC-3 est dégradé par le protéasome en réponse à l'AR (Publications 1 et 3)	113
2.	SUG-1 interagit avec SRC-3 et participe à sa dégradation (Publications 1 et 3)	114
3.	L'ubiquitination de SRC-3 fait intervenir un complexe Cul3-Rbx1 (Publication 3)	115
4.	Le complexe CRL3 participe à la transcription des gènes cibles de l'AR (Publication 3)	116
5.	SRC-3 est phosphorylé en réponse à l'AR (Publication 3)	116
6.	Phospho-dépendance de l'ubiquitination et de la dégradation de SRC-3 (Publication 3)	117

7. La dégradation nucléaire de SRC-3 n'a pas lieu au niveau de la chromatine	117
8. Conclusion	118
II. Dégradation de RARα : un cas à part? (Résultats non publiés)	121
A. RAR α est dégradé par le protéasome indépendamment de SRC-3 et de SUG-1.....	121
B. La dégradation de RAR α ne fait pas intervenir les acteurs classiques.....	122
1. RAR α : une protéine, deux types d'ubiquitination	122
2. E3 impliquée dans l'ubiquitination de RAR α : un cas à part.....	123
C. Dégradation de RAR α : "sous produit" de la transcription?	124
1. Rôle de la phosphorylation des sérines 77 et 369 ?	124
2. L'hélice H12 : sur la bonne piste?	125
D. PTM, dégradation... mais encore?	126
Discussion	127
I. Phosphorylation : régulation "ultrafine" de la réponse à l'AR	127
A. Phosphorylation et interaction de RAR α avec ses partenaires	127
B. Phosphorylation et ubiquitination/dégradation de SRC-3	128
II. Le protéasome : régulation fine de la réponse à l'AR	131
A. Régulation de la transcription des gènes cibles de l'AR en absence de protéolyse	131
1. Recrutement du protéasome <i>via</i> RAR α et/ou ses corégulateurs.....	131
2. Rôles non protéolytiques du protéasome indépendants de RAR α	131
B. Protéasome et recrutement cyclique de SRC-3 sur le promoteur des gènes cibles de l'AR.....	132
C. Conclusion : le système UPS joue un rôle global dans la réponse à l'AR	132
III. Le protéasome et la dégradation massive et tardive de RARα : régulation grossière de la fin du signal AR.....	133
A. Dégradation atypique de RAR α	133
B. Quel est le signal de la dégradation de RAR α ?	133
C. Conclusion	135
Références bibliographiques.....	137

Avant propos

Le génome humain, composé de quelques 3 milliards de paires de bases, comprend l'ensemble des informations nécessaires à la formation d'un individu dès le stade de l'œuf. Au sein de l'embryon, puis de l'individu, aucun tissu n'est identique, tant au niveau de l'ultrastructure que de la fonction. Ainsi, deux cellules filles peuvent avoir des devenir différents alors que leur contenu génétique est le même. **Pourquoi au niveau de l'individu, les cellules lymphocytaires sont-elles différentes des cellules de la peau alors que leur matériel génétique est identique ?** Les principes généraux permettant de répondre à cette question ont été élucidés durant la dernière décennie. Ainsi la transcription, et notamment l'expression régulée des gènes par l'ARN polymérase II, permet l'expression d'un ensemble de gènes restreint mais spécifique d'un type cellulaire donné, et cela parmi les quelques 30 000 gènes prédits du génome humain. De plus, à côté des gènes constitutivement exprimés, se trouvent des gènes dont l'expression va dépendre de stimuli externes (hormone, stress, ...).

La transcription des gènes est un mécanisme complexe faisant intervenir un grand nombre de protéines et de complexes protéiques parmi lesquels on distingue l'ARN polymérase II, le médiateur, les facteurs généraux de la transcription avec leurs protéines associées ainsi que les activateurs de la transcription. Ce sont ces derniers, dont l'expression et la présence au niveau des promoteurs des gènes cibles sont modulables, qui nous intéressent plus particulièrement. Ils sont caractérisés, en règle générale, par la présence d'un domaine de fixation à l'ADN (DBD) et d'un ou plusieurs domaine(s) activateur(s) de la transcription (AF). Les **récepteurs nucléaires** (RN) correspondent à de tels activateurs de la transcription. Chez les Métazoaires, ces récepteurs appartiennent à une superfamille qui englobe les récepteurs nucléaires des hormones stéroïdiennes comme les récepteurs des œstrogènes (ER), de la progestérone (PR), des glucocorticoïdes (GR), des minéralocorticoïdes (MR) et des androgènes (AndR). Elle englobe aussi la famille des récepteurs nucléaires d'hormones non stéroïdiennes, comprenant notamment les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR), d'acide gras (PPAR), de la vitamine D (VDR) et des acides rétinoïques (RAR, RXR).

Historiquement, en plus de ces récepteurs dont le ligand est connu, des récepteurs nucléaires dits « orphelins », dont le ligand n'a pas encore été identifié, ont été aussi découverts. Ces récepteurs ont été isolés sur la base de leur homologie avec les récepteurs non orphelins. La découverte récente, pour certains d'entre eux, d'un ligand leur a fait perdre ce caractère « orphelin ».

Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons aux **récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque**. Il existe deux familles de récepteurs de l'acide rétinoïque (AR), les **RAR** (Retinoic Acid Receptor) qui peuvent lier l'acide rétinoïque *tout-trans* et son isomère *9-cis*, et les **RXR** (Retinoid X Receptor) qui ne lient que l'acide rétinoïque *9-cis*. Chaque famille compte trois sous-types : RAR α (NR1B1), β (NR1B2) et γ (NR1B3) et RXR α (NR2B1), β (NR2B2) et γ (NR2B3) codés par des gènes distincts (Germain et al., 2006c). Pour chaque sous-type, on distingue plusieurs isoformes qui résultent de l'utilisation de promoteurs différents et/ou d'un épissage alternatif (Germain et al., 2006a, b; Laudet and Gronemeyer, 2002).

Les RAR présentent une structure et des domaines bien définis comprenant un domaine N-terminal (NTD) non structuré ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN (DBD) relié à un domaine C-terminal comprenant le site de liaison du ligand (LBD) (Germain et al., 2006c). Les effets des RAR sur la transcription passent d'une part, par leur liaison à l'ADN au niveau de séquences spécifiques nommées RARE (Retinoic Acid Response Element) localisées au sein des promoteurs de gènes cibles et, d'autre part, par des changements conformationnels du LBD induits par le ligand permettant l'association/dissociation de corégulateurs (dont SRC-3), secondés par le **protéasome**. Une fois recrutés, les corégulateurs modifient la chromatine au niveau des promoteurs des gènes cibles et participent à l'initiation de la transcription de ces gènes. Le coactivateur **SRC-3** appartient à la famille des protéines p160 et interagit avec les **RAR** en présence d'AR. Quant au protéasome, il s'agit d'un complexe protéique composé de deux sous-complexes (**20S CP** et **19S RP**) : *via* la dégradation spécifique des protéines ubiquitinées, le protéasome participe d'une part à la dynamique du recrutement des corégulateurs des RN et d'autre part, à la fin du signal rétinoïde **en dégradant les RAR et des coactivateurs dont SRC-3** (Rochette-Egly and Germain, 2009). A noter que le sous-complexe 19S RP du protéasome est également impliqué dans la transcription, indépendamment du 20S CP *via* des **activités chaperonnes non protéolytiques**. Par voie de conséquence, le 19S RP peut être considéré comme un coactivateur.

Des études récentes ont montré qu'en sus de ces effets non génomiques, l'AR active plusieurs voies de signalisation impliquant des kinases qui aboutissent à la phosphorylation de nombreuses cibles dont les **RAR et SRC-3** eux-mêmes. Comme nous le verrons, ces phosphorylations apportent un niveau de régulation supplémentaire vis-à-vis de l'activité transcriptionnelle et de la dégradation des RAR et de SRC-3.

Lors de mon travail de thèse, je me suis particulièrement intéressée au **rôle du protéasome non seulement dans la dégradation de RAR α et de son coactivateur SRC-3 mais aussi dans la transcription des gènes cibles de l'AR, tant par ses activités protéolytiques que non protéolytiques**. J'ai également recherché l'influence **des phosphorylations** de RAR α et SRC-3 dans ces processus.

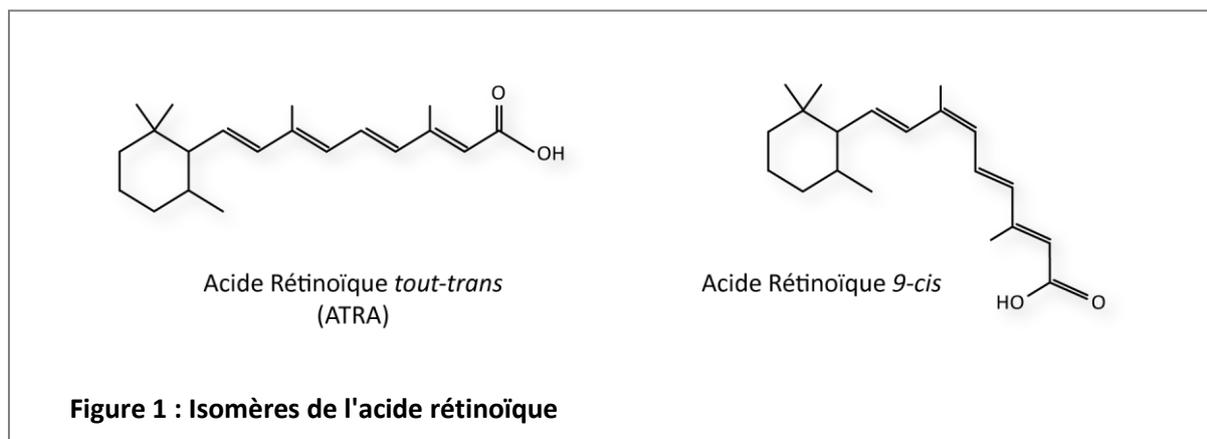
Avant de présenter le système ubiquitine-protéasome et sa participation à la réponse à l'AR, je développerai tout d'abord la structure globale des RAR ainsi que le modèle classique selon lequel ils activent leurs gènes cibles. Puis, je détaillerai les nouveaux concepts établis autour des RAR, en particulier la capacité de l'AR à activer des voies kinasiques *via* des mécanismes non génomiques et comment ces kinases ciblent les RAR et SRC-3. Enfin, je présenterai et discuterai mes résultats en mettant en avant le rôle clé du protéasome dans l'intégration globale du signal rétinéoïde.

Introduction

I. Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont des facteurs de transcription inductibles par le ligand

A. Le ligand : l'acide rétinoïque

L'**Acide Rétinoïque (AR)** est le dérivé biologique actif de la vitamine A ou rétinol (Chambon, 2005; Sporn and Roberts, 1994 , pour revue : Theodosiou et al. , 2010). Il existe deux isomères *9-cis* et *tout-trans* (ATRA) (Figure 1). De manière générale, on regroupe la vitamine A, ses métabolites, l'AR et les analogues de synthèse actifs sous le terme générique "rétinoïdes".



Les rétinoïdes sont des substances de petite taille, hydrophobes et liposolubles, ce qui leur permet de traverser facilement la bicouche lipidique membranaire. Une fois dans le cytoplasme, ils sont pris en charge par les protéines CRBP I, II, III (Cellular Retinol Binding Protein, I, II, III) (Bashor et al., 1973) qui régulent leur métabolisme soit en les stockant, soit en facilitant leur présentation aux différentes enzymes pour des réactions d'estérification ou d'hydrolyse (Napoli, 1999).

B. Les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque

L'AR se fixe à des récepteurs nucléaires (RN) qui appartiennent à deux familles : les **RAR** (Retinoic Acid Receptor) et les **RXR** (Retinoid X Receptor) (Laudet and Gronemeyer, 2001). Alors que les RXR ne lient que l'isomère *9-cis* de l'AR, les RAR peuvent fixer les deux isomères, *tout-trans* et *9-cis*. Au sein de chaque famille, il existe trois sous-types, **RAR α** (NR1B1), **β** (NR1B2), **γ** (NR1B3) et **RXR α** (NR2B1), **β** (NR2B2), **γ** (NR2B3) codés par des gènes différents. Au sein de chaque sous-type, on distingue plusieurs isoformes résultant de l'utilisation de promoteurs différents et/ou d'un épissage alternatif (Germain et al., 2006a, b).

Les récepteurs nucléaires de l'AR agissent sous forme d'hétérodimères RAR/RXR qui se comportent comme des **facteurs de transcription inducibles par le ligand**. Bien que les RAR n'aient que les RXR pour partenaires d'hétérodimérisation, les RXR peuvent soit s'homodimériser, soit s'hétérodimériser avec de nombreux autres RN tels que VDR (Vitamin D Receptor), TR (Th thyroid hormone Receptor), PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor), LXR (Liver X Receptor), FXR (Farnesoid X Receptor), CAR (Constitutively Activated Receptor), PXR (Pregnate X Receptor), NGFIR (Nerve Growth Factor Induced Receptor) et NURR1 (Nuclear Receptor Related 1) (Germain et al., 2006a).

L'expression des RAR et RXR est régulée de façon spatio-temporelle dans l'organisme au cours du développement (Dolle, 2009). Selon l'étape du développement et selon le tissu considéré, un hétérodimère RAR/RXR spécifique va être principalement actif et responsable de l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire, la prolifération ou l'apoptose des cellules (Germain et al., 2006b; Mark et al., 2006, 2009).

1. Structure des RAR et des RXR

Les RAR et RXR présentent une structure modulaire bien définie, commune à la plupart des récepteurs nucléaires. Cette structure est subdivisée en six régions notées de A à F dont certaines correspondent à des domaines fonctionnels importants (Figure 2) (Germain et al., 2006c). Ainsi la région C, centrale, correspond au domaine de fixation de l'ADN et la région E renferme entre autres les domaines de fixation du ligand et de dimérisation.



Figure 2 : Organisation modulaire des RAR

Schéma représentant les trois principaux domaines des RAR : le NTD (N-Terminal Domain), le DBD (DNA Binding Domain) et le LBD (Ligand Binding Domain), auxquels s'ajoutent la région D ou région charnière et la région F, C-terminale.

a. Le domaine de fixation à l'ADN (DBD)

Le domaine de fixation à l'ADN ou **DBD** (DNA Binding Domain) est le domaine le plus structuré et le plus conservé des RN. *Via* ce domaine, les hétérodimères RAR/RXR se fixent à l'ADN au niveau de séquences spécifiques appelées **RARE** (Retinoic Acid Response Element) localisées dans les

Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont des facteurs de transcription inductibles par le ligand

promoteurs des gènes cibles. Ces RARE sont composés de deux séquences hexamériques en répétition directe ou DR (Direct Repeat) séparées par 1 (DR1), 2 (DR2) ou 5 (DR5) nucléotides (Mader et al., 1993a; Mader et al., 1993b). **Le DR5 est défini comme le RARE canonique des RAR/RXR.**

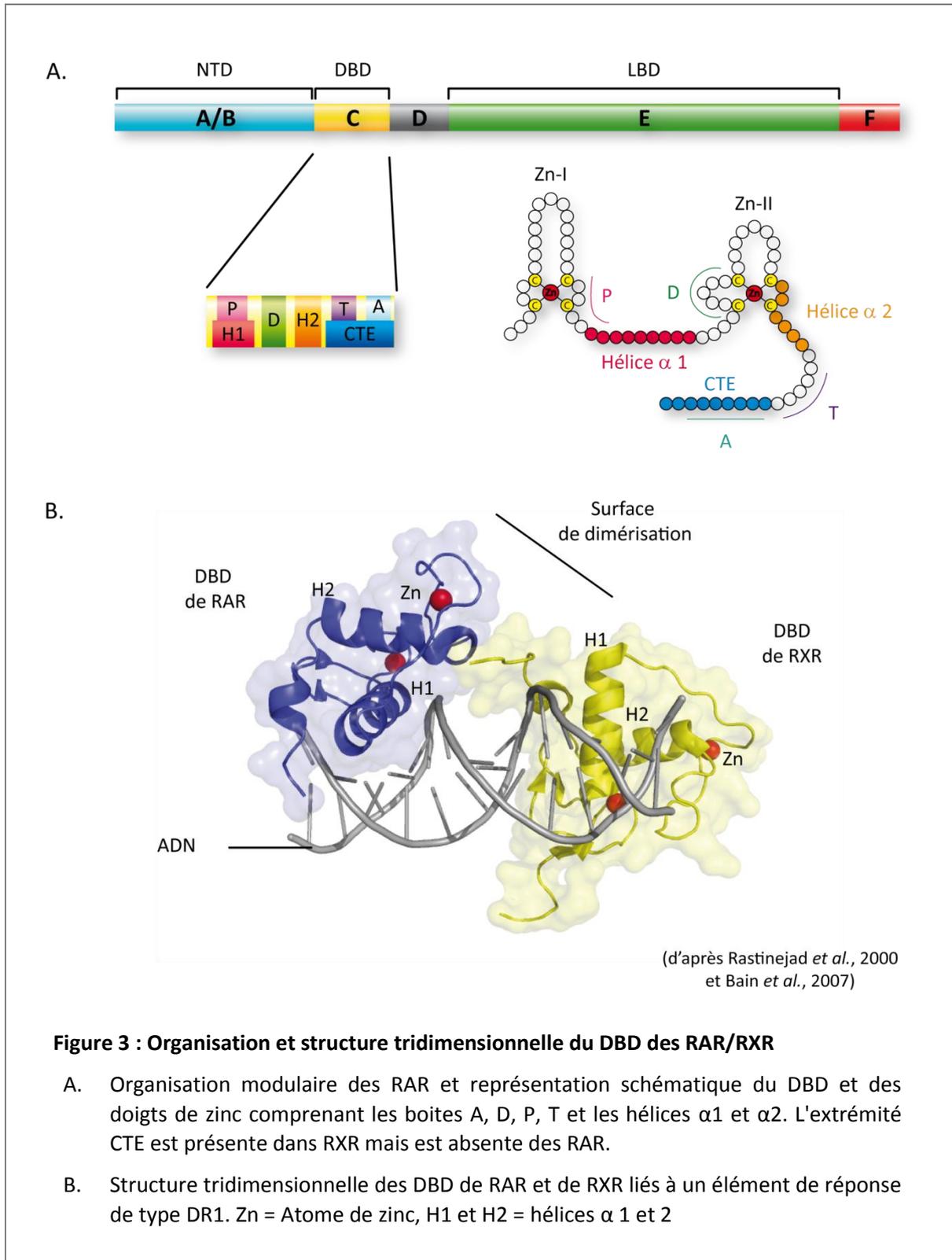
i. Structure du DBD

Des études cristallographiques et de RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) ont permis de proposer une structure tridimensionnelle des DBD isolés ou sous forme de dimères, associés ou non à l'ADN (Figure 3b) (Katahira et al., 1992; Knegtel et al., 1993; Rastinejad et al., 2000).

Le DBD est un domaine globulaire composé de deux motifs en doigt de zinc (où chaque atome de zinc est coordonné par quatre cystéines), de deux hélices α (1 et 2) perpendiculaires et d'une extension C-terminale (Figure 3a) (Freedman et al., 1988). L'hélice α 1 N-terminale sert "d'hélice de reconnaissance". Elle s'insère dans le sillon majeur de l'ADN du demi site et établit des contacts non spécifiques avec les phosphates et les riboses du squelette de l'ADN (interactions électrostatiques) et des contacts spécifiques avec les bases azotées (Rastinejad et al., 1995; Rastinejad et al., 2000). Trois résidus de cette hélice α 1 composent la boîte P et assurent la spécificité de reconnaissance des RARE (Figure 3a) (McEwan, 2009). Quant à l'hélice α 2, elle recouvre perpendiculairement l'hélice α 1 et contribue à la stabilisation de toute la structure.

D'autres résidus conservés délimitent des motifs (boîtes D, T et A) (Figure 3a) qui interviennent dans la reconnaissance des RARE et dans la dimérisation des récepteurs. Ainsi lors de l'interaction d'un hétérodimère RAR/RXR avec un DR5, des résidus du second doigt de zinc du partenaire RXR (boîte D) et du premier doigt de zinc de RAR créent une surface d'interaction entre les deux DBD (Zechel et al., 1994a; Zechel et al., 1994b). Ces interfaces varient selon l'espace entre les demi-sites (Perlmann et al., 1993) et sont à l'origine de la règle de "l'espacement" (Mangelsdorf and Evans, 1995; Umesono et al., 1991).

Les DBD des RAR et RXR présentent des structures relativement semblables. Cependant, le DBD de RXR possède une hélice α C-terminale supplémentaire appelée CTE (COOH-Terminal Extension) qui englobe la boîte T requise pour la fixation des homodimères RXR/RXR à l'ADN. En effet, elle intervient dans la reconnaissance de séquences situées en amont des hémisites (Lee et al., 1994) et apporte des contraintes stériques supplémentaires qui participent à la bonne reconnaissance des éléments de réponse en fonction des partenaires d'homo- et d'hétérodimérisation de RXR. Il est à noter que selon le récepteur avec lequel il est associé, le DBD de RXR adopte des conformations différentes et s'adapte ainsi aux différents éléments de réponse.



D'après un nombre croissant de données, l'ADN ne sert pas seulement d'ancrage aux récepteurs pour permettre le recrutement de la machinerie transcriptionnelle, mais agit également comme un ligand capable d'induire des changements conformationnels des RN *via* des mécanismes allostériques (Gronemeyer and Bourguet, 2009; Lefstin and Yamamoto, 1998). Ainsi Holmbeck *et al.*,

Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont des facteurs de transcription inductibles par le ligand

ont montré que des hélices α se forment ou se perdent au sein de RXR suite à sa fixation sur l'ADN (Holmbeck et al., 1998). Cependant, les mécanismes physiques de ces changements restent encore inconnus.

ii. Eléments de réponse (RARE)

Les hétérodimères se fixent préférentiellement et avec la plus grande affinité à des DR5 (Figure 4) (Leid et al., 1992; Umesono et al., 1991). Cependant ils peuvent également se lier à des DR2 ou des DR1 avec une affinité décroissante (Figure 4).

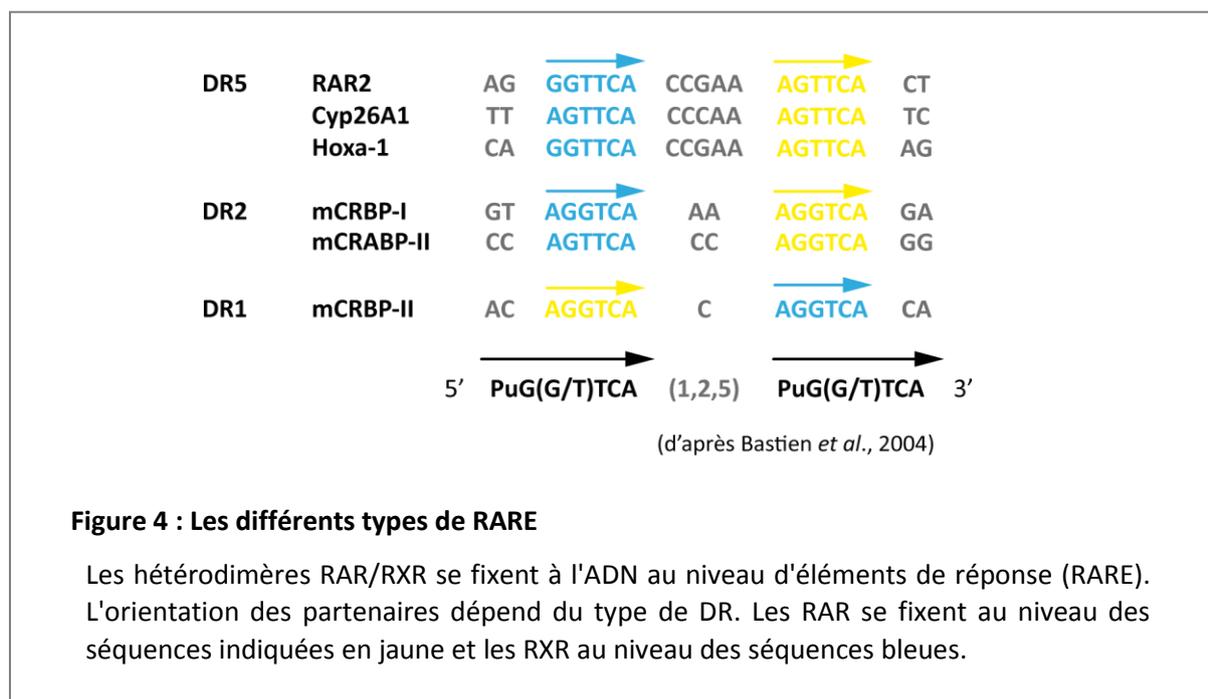


Figure 4 : Les différents types de RARE

Les hétérodimères RAR/RXR se fixent à l'ADN au niveau d'éléments de réponse (RARE). L'orientation des partenaires dépend du type de DR. Les RAR se fixent au niveau des séquences indiquées en jaune et les RXR au niveau des séquences bleues.

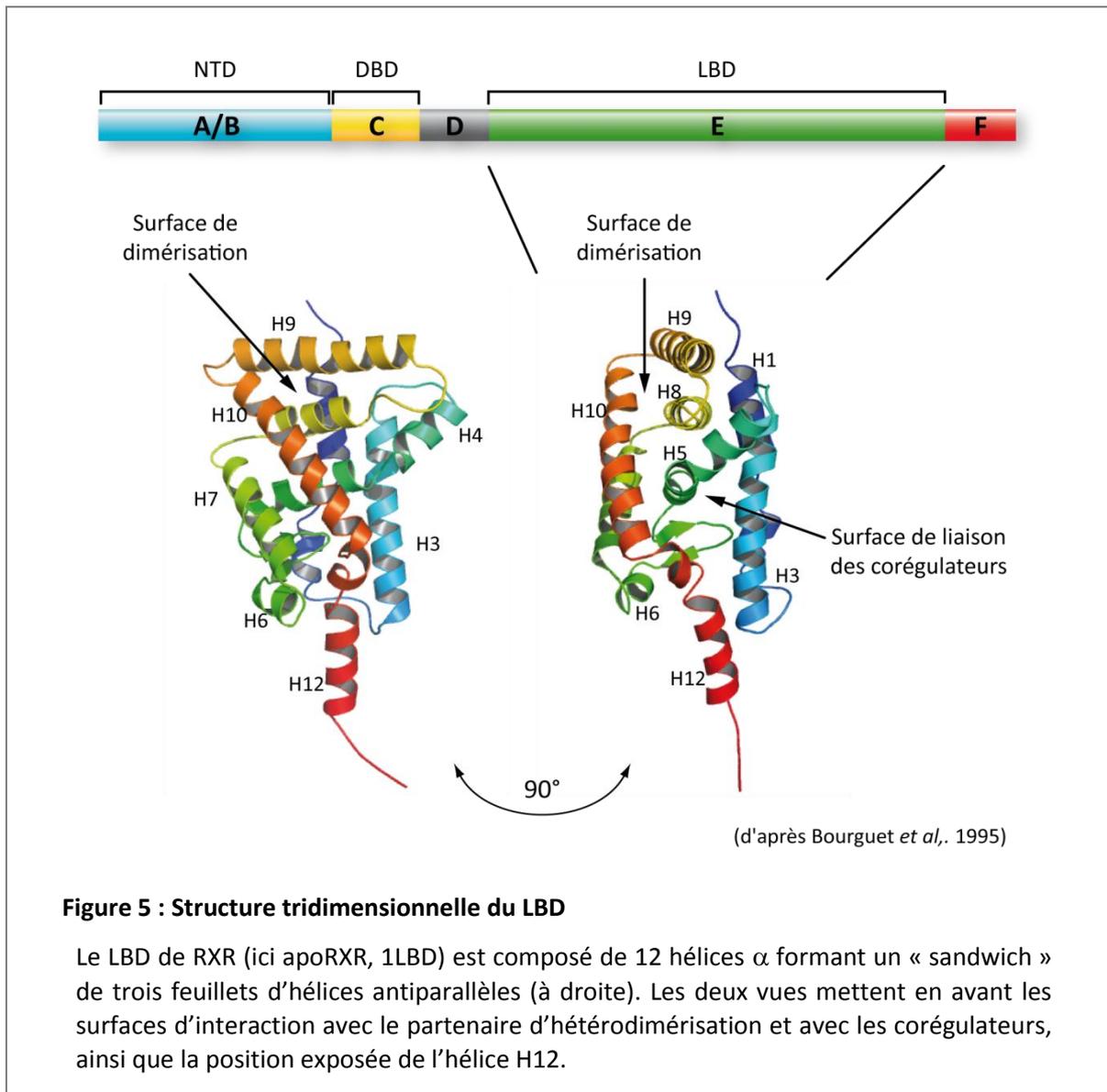
L'espacement entre les DR va régir l'orientation de l'hétérodimère sur l'ADN. Dans le cas des DR5 et DR2, le demi-site en 5' est occupé par le partenaire RXR et le demi-site en 3' par RAR (Figure 4). Par contre, dans le cas des DR1, cette orientation est inversée avec le RAR sur l'hémisite 5' et le RXR sur l'hémisite 3'. Les interactions entre les récepteurs, déterminées par l'espacement entre les deux demi-sites, font alors intervenir des régions distinctes (Perlmann et al., 1993; Rastinejad et al., 1995) d'où des réponses transcriptionnelles différentes. En effet, **l'hétérodimère RAR/RXR a un rôle répresseur lorsqu'il est fixé à un DR1 et un rôle activateur lorsqu'il est fixé à des DR5 ou à des DR2** (Kurokawa et al., 1995; Zamir et al., 1997).

Des RARE ont été identifiés dans un grand nombre de promoteurs de gènes cibles de l'AR intervenant dans des fonctions très variées. Le RARE classique ou DR5, est retrouvé dans le promoteur des gènes impliqués dans la signalisation de l'AR (*RAR β 2*, *CYP26A1*) (de The et al., 1990; Loudig et al., 2000) et dans le développement (*Hox*, *HNF*) (Dupe et al., 1997; Qian et al., 2000). Des

Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont des facteurs de transcription inducibles par le ligand

DR2 ont été identifiés dans le promoteur des gènes *CRABP2* et *CRPB1* (Durand et al., 1992; Smith et al., 1991). Enfin, seul un DR1 a été découvert dans le promoteur du gène *CRBP2* chez le rat (Mangelsdorf et al., 1991). A l'heure actuelle, les analyses *in silico* et de ChIP (Chromatin ImmunoPrecipitation) à l'échelle du génome augmentent cette liste de gènes avec les RARE correspondants (Biddie et al. , 2010; Delacroix et al. , 2010; Martens et al. , 2010).

b. Le domaine de fixation du ligand (LBD)



Le domaine de fixation du ligand ou **LBD** (Ligand Binding Domain) est, après le DBD, le deuxième domaine conservé non seulement parmi les RN, mais aussi au sein des sous-types de RAR (Figure 5). En plus de sa fonction de reconnaissance et de fixation du ligand *via* une poche spécifique (LBP : Ligand Binding Pocket), ce domaine participe à la dimérisation des récepteurs, au recrutement

Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont des facteurs de transcription inductibles par le ligand

de corégulateurs et renferme une **fonction de transactivation dépendante du ligand appelée AF-2** (Activation Function 2).

Depuis la détermination de la structure du LBD de RXR α en absence de ligand (apo) et de RAR γ en présence de ligand (holo) (Bourguet et al., 1995; Renaud et al., 1995), de nombreuses structures des LBD des RAR et RXR sous forme apo/holo, en présence ou non de corégulateurs ont été proposées (Bourguet et al., 2000b; Egea et al., 2001; Klaholz et al., 1998; le Maire et al., 2010) et ont montré que le LBD est construit selon un **modèle commun à tous les RN** (Wurtz et al., 1996). Typiquement, le LBD est un domaine globulaire constitué de 11 (dans le cas de RAR γ) à 12 (pour RAR α et β) hélices α conservées et d'un feuillet β court à deux brins β situé entre les hélices H5 et H6 (Figure 5). L'ensemble de ces hélices forme un "sandwich" de trois feuillets d'hélices antiparallèles bordant au centre, une poche hydrophobe.

i. Poche de fixation du ligand (LBP)

La poche de fixation du ligand ou **LBP** est localisée dans la partie inférieure du LBD et constitue la région variable de celui-ci. La fixation du ligand stabilise le LBD rendant ainsi la structure plus compacte et plus rigide (Pissios et al., 2000; Watkins et al., 2003).

La LBP est essentiellement composée d'acides aminés appartenant aux hélices H3, H5, H11 et au feuillet β (Klaholz et al., 2000). La spécificité et l'affinité du complexe LBD-ligand reposent sur trois paramètres : (i) la taille et la forme de la poche de liaison, (ii) la présence de résidus polaires assurant l'ancrage du ligand, (iii) l'établissement de nombreuses interactions hydrophobes, de Van der Waals et d'un réseau étendu de liaisons hydrogène (Gehin et al., 1999; Klaholz et al., 2000).

La taille ainsi que la forme de la poche sont fortement modulables et peuvent ainsi accueillir des ligands non apparentés aux ligands naturels (Huang et al., 2010). Cette dernière propriété est exploitée dans la recherche par "drug design" d'agonistes ou d'antagonistes des RAR et des RN en général, pour le traitement de certaines pathologies impliquant spécifiquement certains récepteurs nucléaires.

Il est à noter que chez l'Homme, seuls trois résidus sont impliqués dans la reconnaissance de l'AR. Ces résidus divergent entre les sous-types RAR α , β et γ (Tableau 1) conférant ainsi une sélectivité vis-à-vis du ligand, pour chaque sous-type (Gehin et al., 1999; Klaholz et al., 2000).

Récepteur	Hélice 3	Hélice 5	Hélice 11
RAR α	Ser232	Ile270	Val395
RAR β	Ala225	Ile263	Val388
RAR γ	Ala234	Met272	Ala397

(d'après Gronemeyer *et al.*, 2004)

Tableau 1 : Divergences entre les LBD des RAR

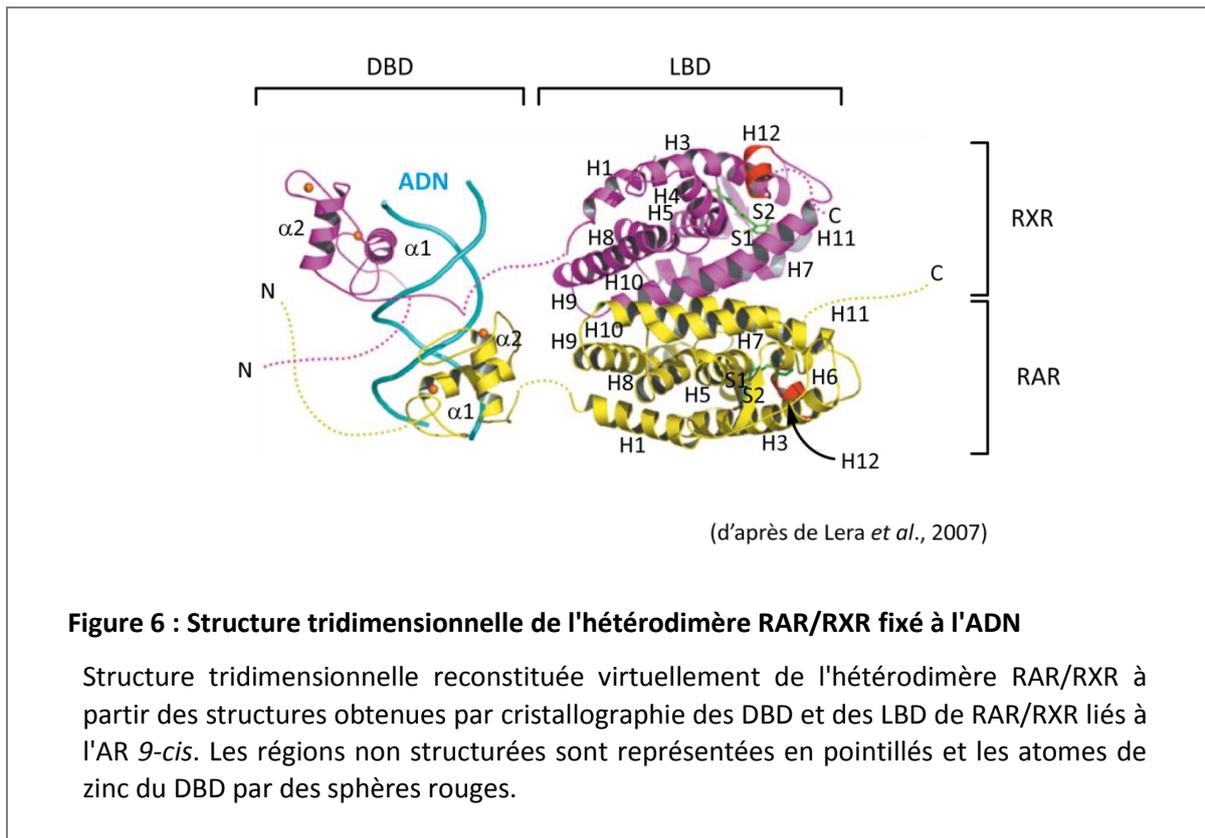
Trois résidus des LBD des isotypes de RAR divergent et induisent des variations dans la réponse à l'AR.

Enfin, dans le cas des RAR et contrairement aux autres RN, le ligand s'adapterait à la poche. En effet, la structure obtenue par cristallographie du LBD de RAR γ ayant fixé l'AR *tout-trans* ou *9-cis* montre que l'isomère *9-cis* adopte une structure inhabituelle qui se rapprocherait de celle du *tout-trans* (Klaholz *et al.*, 1998).

ii. Interface de dimérisation

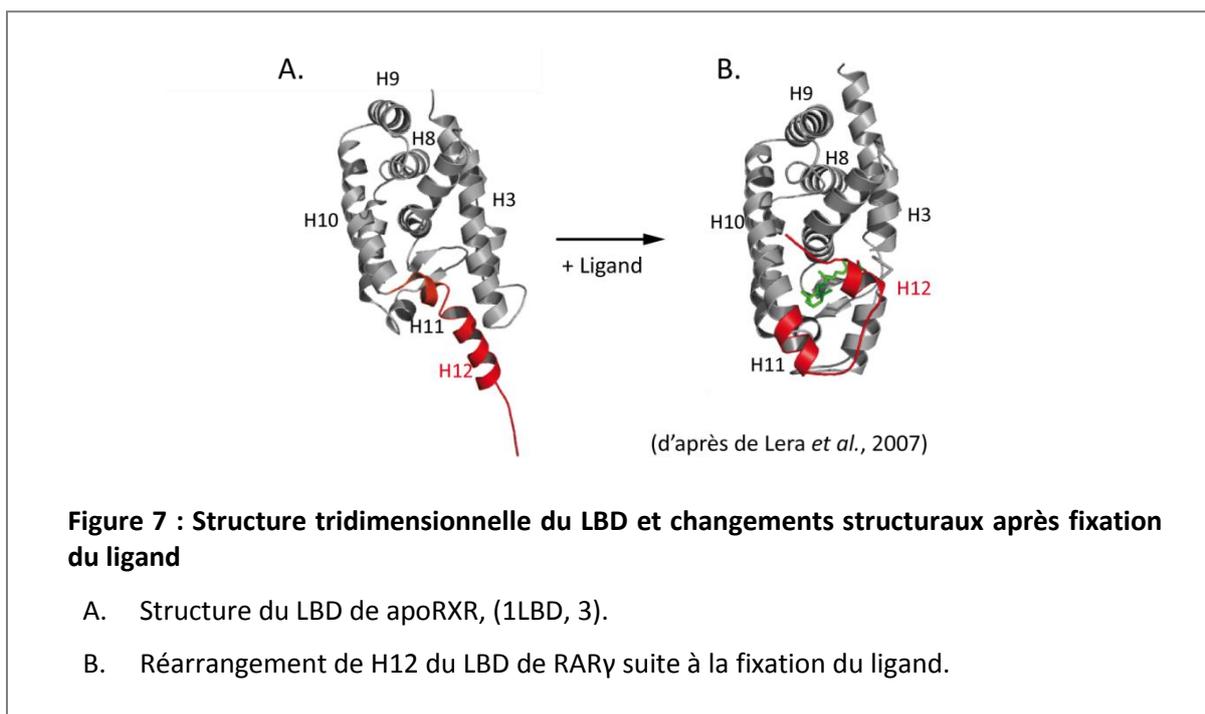
L'hétérodimérisation des RAR et RXR est assurée par des interactions non seulement au niveau des DBD (ADN-dépendante) mais surtout au niveau des LBD (Bourguet *et al.*, 2000b; Gampe *et al.*, 2000). En effet, d'après les données obtenues par cristallographie, l'hétérodimérisation met en jeu essentiellement des résidus des hélices H7, H9, H10 et H11 et des boucles L8-9 et L9-10. L'ensemble de ces résidus forme une zone hydrophobe entourée d'acides aminés chargés ou polaires (Figure 6) (Bourguet *et al.*, 2000a).

De manière intéressante, suite à la fixation du ligand, les surfaces d'hétérodimérisation transmettraient des changements allostériques subtils qui affecteraient la stabilité des hétérodimères. Ainsi la poche de fixation du ligand des RAR serait énergétiquement liée à la surface de dimérisation (Brelivet *et al.*, 2004; Pogenberg *et al.*, 2005).



iii. L'hélice H12 C-terminale : changements structuraux suite à la fixation du ligand

La comparaison des structures cristallographiques des LBD des formes apo des RXR α et holo de RAR γ a permis de mettre en évidence des changements structuraux importants (Figure 7) qui sont à la base moléculaire de leur activité transcriptionnelle.



En absence de ligand, les hélices H10 et H11 sont perpendiculaires et participent principalement à la zone hydrophobe de la poche de fixation du ligand. L'hélice H12, exposée au solvant, pointe vers l'extérieur et présente une mobilité relative indépendante du reste du LBD (Kallenberger et al., 2003). Suite à la fixation du ligand, les premiers changements structuraux affectent les hélices H3 et H11 puis l'hélice H12. En effet, l'hélice H11 subit une rotation de 180° autour de son axe, ce qui la positionne dans la continuité de l'hélice H10. La partie N-terminale de l'hélice H3 s'incline vers le ligand fixé. Le changement structural le plus important est celui de l'**hélice H12** qui bascule au dessus de l'hélice H4 et referme la poche de fixation du ligand à la façon d'un "**piège à souris**" (Figure 7) (de Lera et al., 2007; Moras and Gronemeyer, 1998). L'hélice H12 gagne en rigidité *via* l'établissement de ponts salins avec des résidus de l'hélice H3 et *via* des interactions avec le ligand (Bourguet et al., 1995).

Dans cette conformation holo, certains résidus des hélices H12, H3 et H4 vont être exposés au solvant, formant ainsi un sillon hydrophobe appelé domaine AF-2 propice aux interactions avec des coactivateurs. Des expériences de mutagenèse entraînant des perturbations du positionnement de l'hélice H12 et donc du domaine AF-2 ont des répercussions dramatiques sur l'activité transcriptionnelle des RAR/RXR (cf paragraphe I.B.2.b.i) (Lefebvre et al., 1998).

A noter, que dans le cas des sous-types RAR β et RAR γ en absence de ligand, l'hélice H12 interagirait avec l'hélice H3 et adopterait une conformation mimant la conformation RAR α ayant fixé le ligand (Farboud et al., 2003; Farboud and Privalsky, 2004; Hauksdottir et al., 2003). Ceci serait à la base d'interactions différentes de ces récepteurs avec des corégulateurs comme il sera détaillé par la suite.

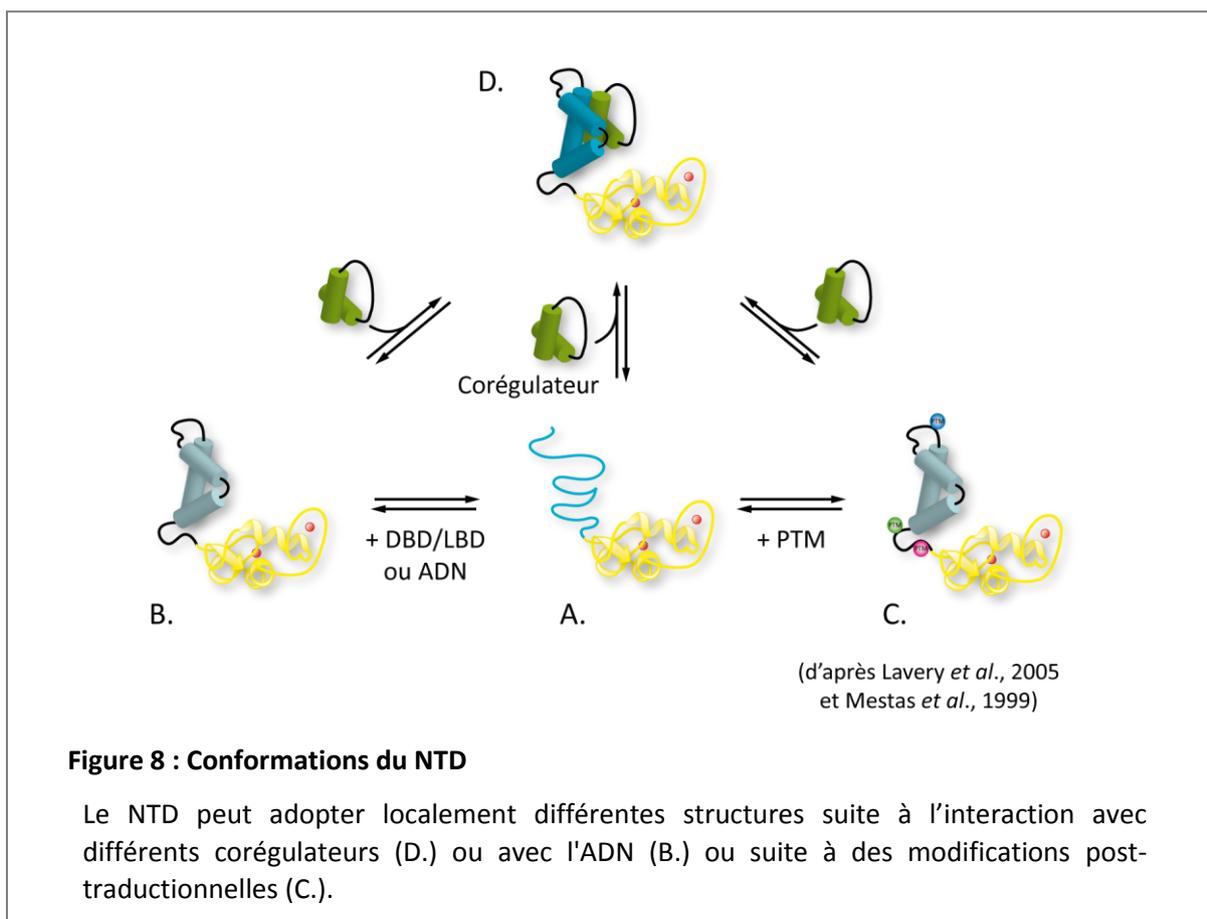
c. Le domaine N-terminal (NTD)

Le domaine N-terminal ou **NTD** (**N**-**T**erminal **D**omain), correspond aux régions A/B. C'est le domaine qui diffère le plus en séquence et en longueur non seulement entre les différents RN, mais aussi entre les RAR et les RXR. La région A est la plus variable entre les différents sous-types et isoformes des RAR et RXR (Chambon, 1996). Par contre, au sein des RAR, la région B est conservée et présente un **motif riche en prolines** ou **MRP**. Ce motif contient des sites de phosphorylation comme il sera abordé dans le paragraphe III.A.1.

Le NTD possède une **fonction activatrice de la transcription ligand-indépendante** appelée **AF-1** (**A**ctivation **F**onction **1**). En effet, de manière isolée, le NTD est capable d'activer la transcription des gènes cibles de l'AR en absence de ligand (Nagpal et al., 1993; Taneja et al., 1997). Cependant, le NTD agit essentiellement en synergie avec le LBD et le ligand pour activer la transcription.

Actuellement aucune structure tertiaire des NTD des RAR et RXR n'a été obtenue. D'après de nombreuses études biochimiques et des prédictions algorithmiques, cette région serait pas ou peu structurée (Dahlman-Wright et al., 1995; Warnmark et al., 2001). Ainsi le NTD a été défini comme un **domaine naturellement désordonné** ou **IUD** (Intrinsically Unstructured Domain) (figure 8a) (Lavery and McEwan, 2005; McEwan et al., 2007). Cependant, il est fort probable que le NTD soit stabilisé et donc "pseudo" structuré dans le contexte de la protéine entière (Figure 8b). En effet, il a été montré dans le cas des récepteurs PR et GR que les DBD augmentent la stabilité et la structuration des domaines N-terminaux (Bain et al., 2001).

De manière intéressante, ces IUD ont la capacité d'acquérir des structures secondaires ou tertiaires suite à l'interaction avec d'autres protéines et/ou avec l'ADN. En effet, il a été proposé que le NTD des RN pourrait se structurer localement ou plus globalement suite à des interactions avec des corégulateurs (Figure 8d) ou en fonction d'effets allostériques résultant de la fixation à l'ADN ou de la proximité du DBD (Figure 8b) (Dyson and Wright, 2005; Lavery and McEwan, 2005; Warnmark et al., 2003; Wright and Dyson, 2009).



Récemment quelques corégulateurs interagissant avec le NTD des RAR ont été isolés. En effet, des cribles doubles-hybride réalisés par des laboratoires différents ont mis en évidence trois nouveaux interactants des NTD des RAR : la vinexine β , Acinus-S' et HACE1.

Au laboratoire, le premier interactant du NTD du sous-type RAR γ a été mis en évidence : la **vinexine β** (Bour et al., 2005b). Cette protéine, membre de la famille des protéines du cytosquelette est dépourvue d'activité enzymatique mais jouerait un rôle d'échafaudage pour le recrutement de corépresseurs. En effet, elle interagit avec RAR γ dans le noyau en absence de ligand et réprime la transcription des gènes cibles de l'AR (Bour et al., 2007). De façon intéressante, cette interaction met en jeu un domaine SH3 de la vinexine β et le MRP de RAR γ (Bour et al., 2005b; Lalevee et al., 2010).

Quant à la protéine **Acinus-S'/ACIN1** (Appoptotic Chromatin condensation Inducer in the Nucleus) appartenant à la famille Acinus, elle interagirait avec le NTD de RAR β et d'après les travaux de Vucetic *et al.*, cette protéine jouerait également un rôle répresseur (Vucetic et al., 2008). De même, **HAEC1** (HECT domain and Ankyrin repeat Containing E3 ubiquitin-protein ligase 1), une E3 ubiquitine ligase, interagit avec le NTD des RAR et réprimerait leur activité transcriptionnelle (Zhao et al., 2009). Cependant, la relation avec l'activité ubiquitine ligase de HAEC1 est encore peu claire (Zhao et al., 2009).

Enfin, les NTD des RAR et RXR renferment une forte proportion de résidus sérine et proline qui forment des MRP et sont des cibles pour des kinases. Etant donné que dans des systèmes simples tels que des peptides, la phosphorylation de certains résidus stabilise ou déstabilise une structure secondaire (Mestas and Lumb, 1999), il a été proposé que les processus de phosphorylation influenceraient la structure du NTD soit directement (Figure 8c) soit *via* la stabilisation de complexes (Bielska and Zondlo, 2006).

d. La région D

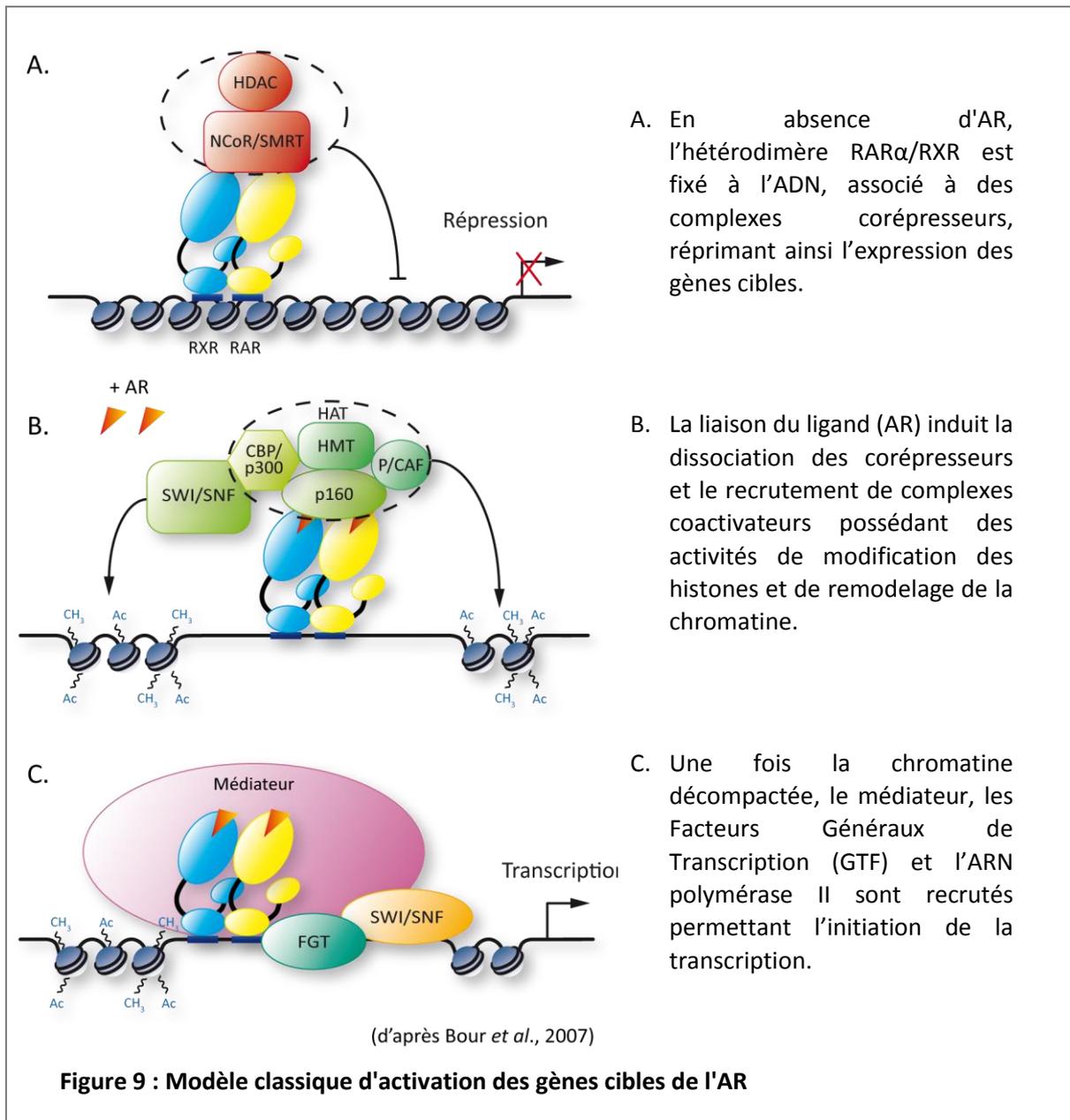
La région D, aussi appelée "**hinge**" est très peu conservée entre les différents RN et n'a pas de fonction clairement définie. Cependant, elle présente une séquence de localisation nucléaire (NLS : Nuclear Localization Signal) (Hamy et al., 1991). En fait, elle servirait essentiellement de **charnière** entre le DBD et le LBD permettant aux deux domaines d'adopter des conformations différentes en réponse au ligand sans générer d'encombrement stérique (Chandra et al., 2008; Driscoll et al., 1996).

e. La région F, C-terminale

La région F est très variable en longueur comme en séquence selon les sous-types de RAR et est absente de RXR. Sa structure et sa fonction restent actuellement peu connues. Dans le cas de RAR α , il a été proposé que cette région, en continuité de l'hélice H12, apporterait un niveau de régulation supplémentaire dans l'activité transcriptionnelle du récepteur. En effet en absence de ligand, la région F stabiliserait l'hélice H12, favorisant l'interaction avec les corépresseurs (Farboud and Privalsky, 2004). De plus cette région riche en glycines, prolines et sérines est la cible de nombreuses phosphorylations (Bastien et al., 2000; Rochette-Egly et al., 1997) (cf paragraphe III.A.1). Enfin, elle servirait d'ancrage pour des ARNm spécifiques (Poon and Chen, 2008) (cf paragraphe I.B.3).

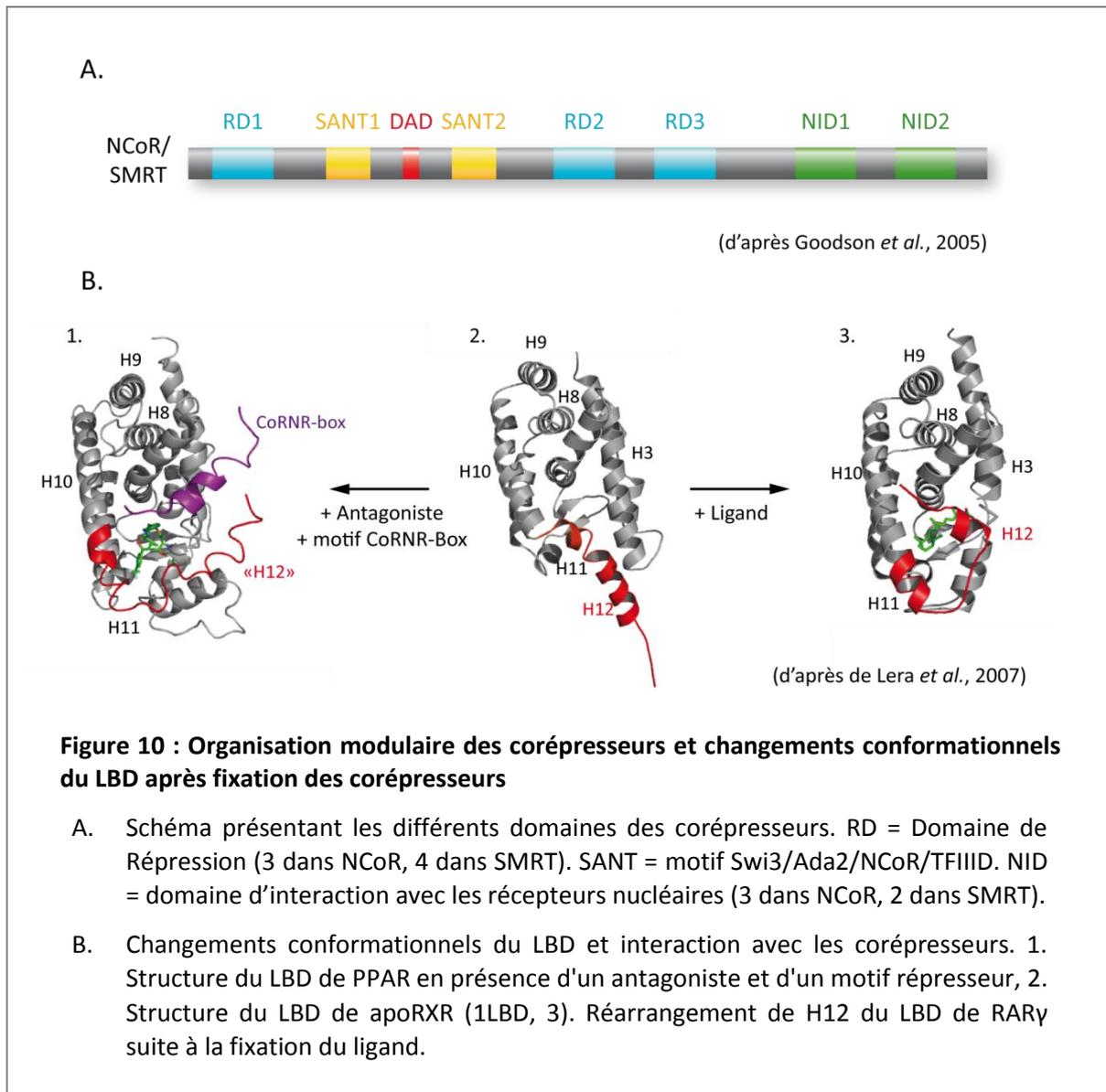
2. Activité transcriptionnelle des RAR : modèle classique établi pour RAR α

Le LBD joue un rôle clé dans l'activité transcriptionnelle des hétérodimères RAR α /RXR en raison de sa capacité à interagir soit avec des corépresseurs, soit avec des coactivateurs en fonction de la fixation ou non du ligand. Des interactions dynamiques avec de tels corégulateurs au sein de complexes possédant des activités enzymatiques diverses vont moduler l'état de compaction de la chromatine et ainsi le recrutement de la machinerie transcriptionnelle pour *in fine*, réguler la transcription des gènes cibles (Figure 9).



a. Répression en absence de ligand

En absence du ligand, les hétérodimères RAR α /RXR fixés aux RARE interagissent avec des corépresseurs qui maintiennent la chromatine dans un état compacté. Ils sont donc transcriptionnellement silencieux. Les premiers corépresseurs identifiés ont été **SMRT** (Silencing Mediator of Retinoid and Th thyroid hormone receptors)/TRAC3 (T3R-Associated Cofactor) et **N-CoR** (Nuclear hormone receptor Corepressor)/RIP13 (Receptor Interacting Protein 13) (Chen and Evans, 1995; Horlein et al., 1995; Sande and Privalsky, 1996; Seol et al., 1996; Zamir et al., 1996).



N-CoR et SMRT présentent une forte homologie de séquence (plus de 45% d'identité de séquence) (Privalsky, 2004) et des fonctions de répression similaires. De plus, ces deux protéines arborent une architecture moléculaire commune (Figure 10a) et leurs régions N- et C-terminales sont fortement conservées.

La région N-terminale confère les propriétés répressives *via* des domaines d'interaction protéine-protéine nommés RD (Repression Domain) et SANT (Swi3/Ada3/N-CoR/TFIID) (Lazar, 2003; Stanya and Kao, 2009). Entre les motifs SANT se trouve un domaine DAD (Deacetylase Activating Domain) qui participe au recrutement et à l'activation des HDAC (Histone DeAcetylase) (Guenther et al., 2001). La région C-terminale, quant à elle, renferme deux (SMRT) ou trois (N-CoR) domaines **NID** (Nuclear receptor Interaction Domain) impliqués dans l'interaction avec les RN (Cohen et al., 2001; Seol et al., 1996; Zamir et al., 1996). Ces NID sont composés d'un ou plusieurs motifs d'interaction

appelés **CoR-NR** (Corepressor-NR boxes) caractérisés par la séquence **LXXI/HIXXXI/L** (où L est une leucine et X un acide aminé quelconque) (Hu and Lazar, 1999; Nagy et al., 1999; Perissi et al., 1999). Le motif CoR-NR forme une hélice α qui s'insère dans le sillon hydrophobe généré par les hélices H3 et H4 et par la boucle L3-4 (Figure 10 b). Il est à noter que la partie N-terminale du motif masque la surface d'interaction de l'hélice H12. Ceci explique pourquoi **les interactions récepteur-corépresseurs ou récepteur-coactivateurs sont mutuellement exclusives** (Nagy et al., 1999). Les motifs NID ne présentent pas les mêmes affinités pour les RAR et RXR. Alors que les RXR se lient indifféremment aux deux corépresseurs (Germain et al., 2002; Wong and Privalsky, 1998), RAR α et RAR γ interagissent préférentiellement avec SRMT et moins fortement avec N-CoR. Quant à RAR β , il fixe les deux corépresseurs avec une très faible affinité.

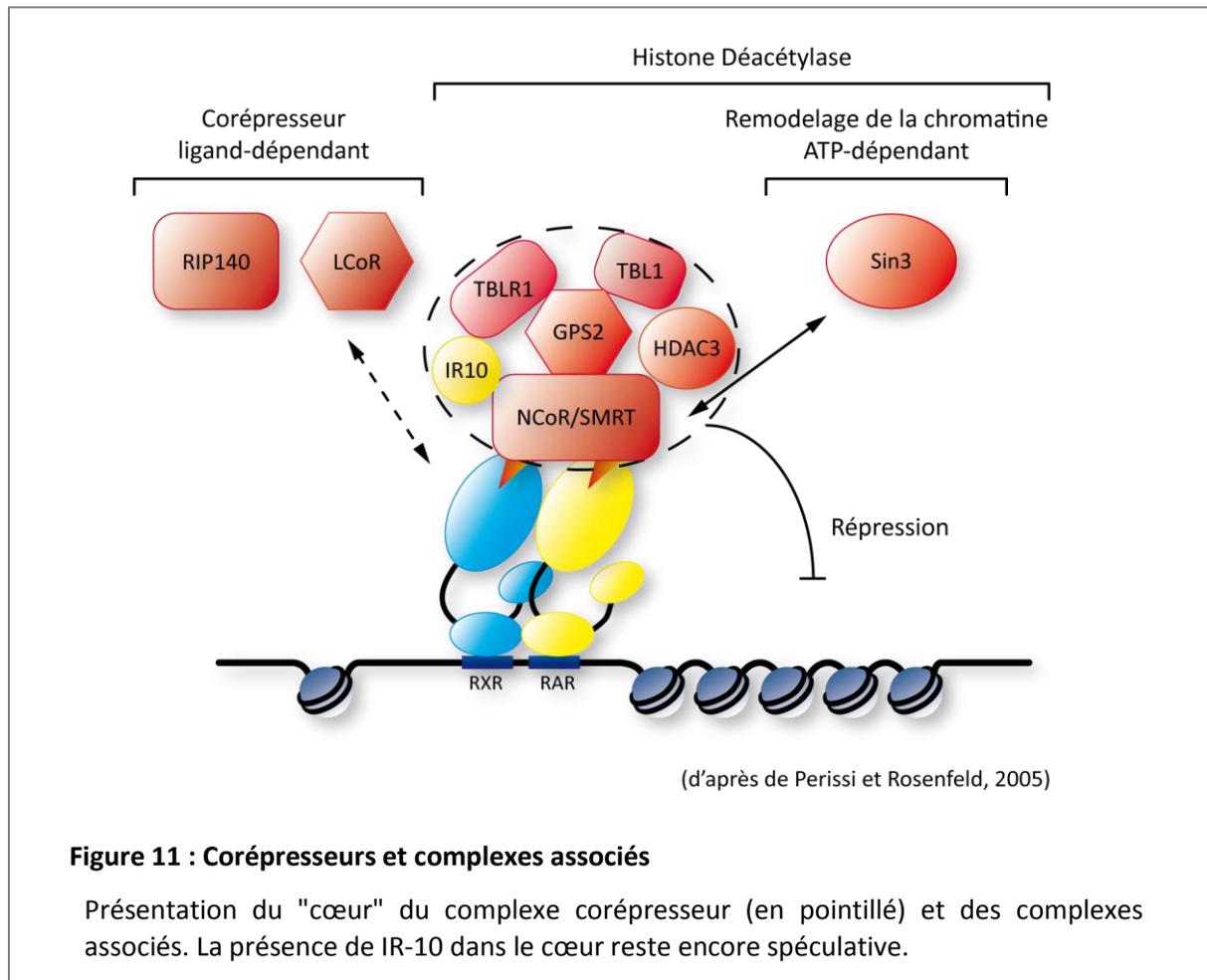
De façon tout à fait intéressante, SMRT et N-CoR sont **dépourvus d'activité enzymatique** intrinsèque. En fait, ils interagissent directement avec les RN et servent de **plateforme** *via* leurs motifs RD et SANT, pour le recrutement de complexes macromoléculaires possédant souvent plusieurs activités enzymatiques comme les HDAC (Figure 11). Les protéines **HDAC3**, **TBL-1** (Transducin β -Like protein 1), **TBLR1** (TBL1-Related protein 1), **GPS2** (G Protein pathway Suppressor 2) (Jones and Shi, 2003; Torchia et al., 1998) composent le "cœur" du complexe auquel s'ajoutent d'autres partenaires (Perissi et al., 2010) tels que les HDAC 1-5, 7 et mSin3 (mammalian Switch independent 3 protein) (Alland et al., 1997; Heinzel et al., 1997; Nagy et al., 1997).

L'activité répressive repose sur la coopération entre les différents partenaires : le complexe corépresseur, recruté par les récepteurs nucléaires, reconnaît initialement les queues des histones acétylées (Yu et al., 2003). Cette interaction activerait la fonction enzymatique de la protéine HDAC3 qui en retour désacétylerait les queues des histones (Guenther et al., 2000). Ainsi, en absence d'AR, le complexe maintiendrait la chromatine sous forme désacétylée et compactée, réprimant l'expression des gènes cibles (Hartman et al., 2005; Vermeulen et al., 2004). SMRT et N-CoR inhibent également l'initiation de la transcription *via* des contacts avec TFIIB (Transcription Factor II B) et TAF30 (TBP Associated Factor 30) (Muscat et al., 1998; Wong and Privalsky, 1998), empêchant ainsi la formation du PIC (Pre Initiation Complexe).

Des travaux récents ont montré que SMRT, N-CoR et leurs protéines associées peuvent subir des modifications post-traductionnelles ou PTM (Post Translational Modification) (phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, etc.). Ces modifications réguleraient les dynamiques d'association/dissociation des complexes (Perissi et al., 2004; Perissi and Rosenfeld, 2005; Perissi et al., 2008; Stanya et al., 2008; Tiefenbach et al., 2006), leur demi-vie, leur localisation cellulaire (Hong and Privalsky, 2000) et leur activité répressive (Tiefenbach et al., 2006). La régulation de l'activité

Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont des facteurs de transcription inducibles par le ligand

répressive a également lieu au niveau de l'épissage alternatif des ARNm de SMRT et N-CoR qui entraîne la disparition de certains motifs de répression ou de liaison aux RN (Faist et al., 2009; Goodson et al., 2005a; Goodson et al., 2005b; Jonas et al., 2007).



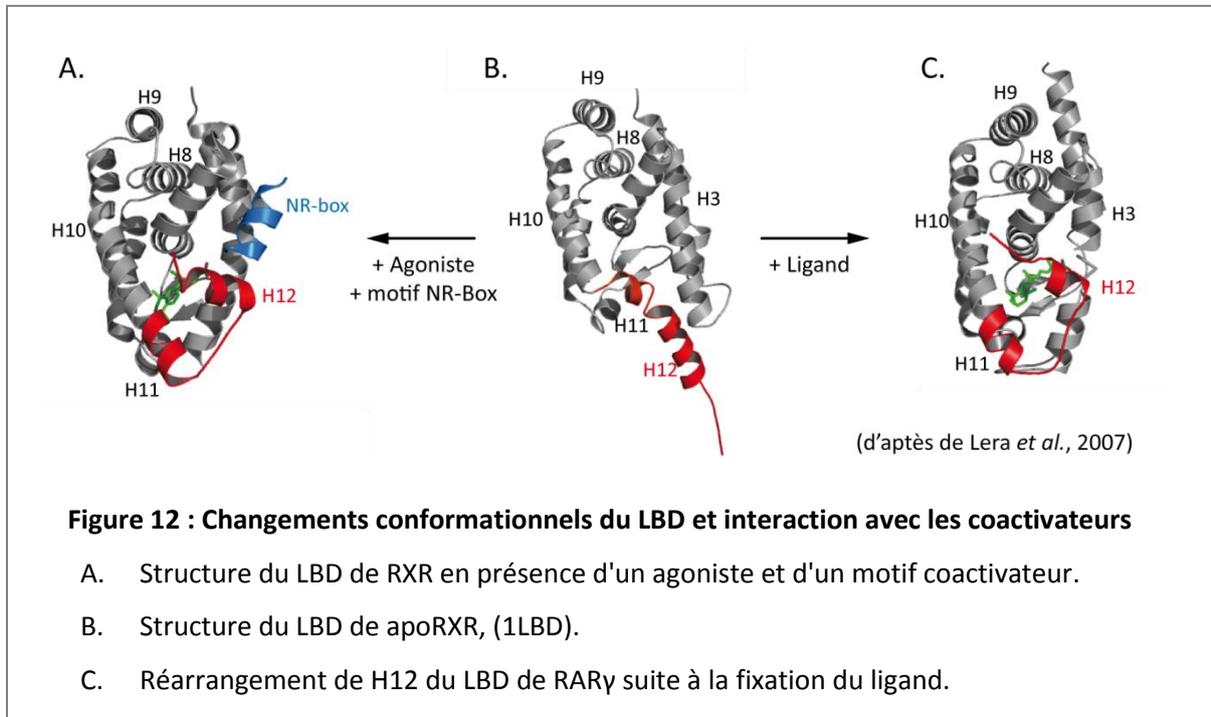
b. Activation en réponse à l'AR

i. Modèle classique d'activation *via* le recrutement de corégulateurs

L'étape clé dans la réponse à l'AR est la fixation du ligand car elle induit des changements conformationnels au niveau de l'hélice H12 du LBD, entraînant le départ des corépresseurs et le recrutement des coactivateurs.

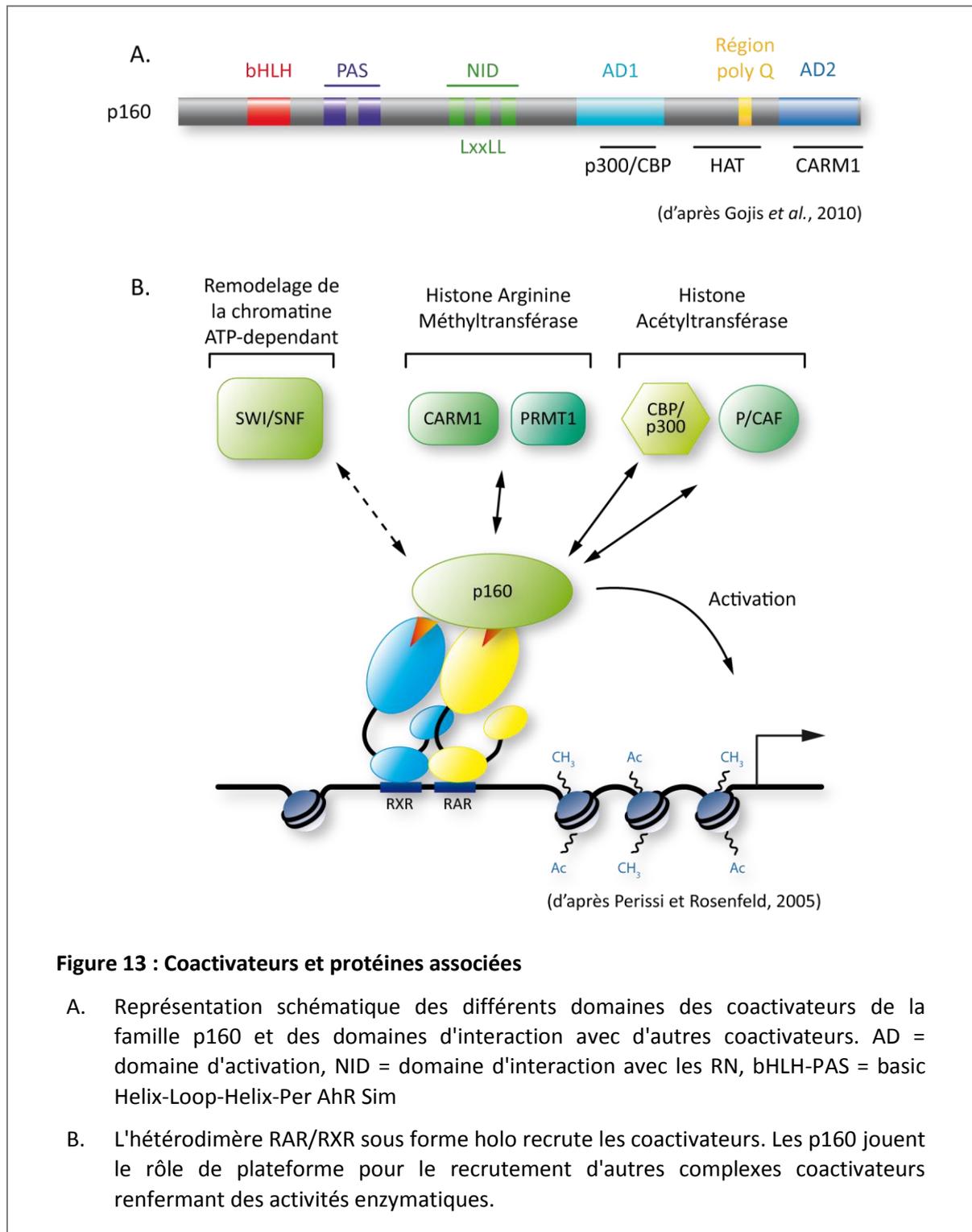
De manière générale, les coactivateurs qui interagissent avec le domaine AF-2 des RAR suite à la fixation du ligand, possèdent un domaine **NID** souvent composé de plusieurs motifs conservés du type **LxxLL** ou NR box (Figure 13) (Heery et al., 1997). Ce domaine est **nécessaire et suffisant** à l'interaction récepteur-coactivateur (Chang et al., 1999; Heery et al., 1997). Les structures de complexes mettant en jeu un LBD ayant fixé le ligand et des peptides correspondant aux NR-box ont été obtenues : le motif LxxLL forme une hélice α qui s'insère dans le sillon hydrophobe du domaine

AF-2 *via* les chaînes latérales des leucines (Figure 12) (Darimont et al., 1998; Nolte et al., 1998). L'ensemble est stabilisé par l'établissement d'une liaison entre une lysine de l'hélice H3 et un glutamate de l'hélice H12.



Les coactivateurs sont représentés par la **famille des protéines p160** (**SRC-1** (Steroid Receptor Coactivator 1)/**NCoA1** (Nuclear Receptor Coactivator 1), **SRC-2/TIF2** (Transcriptional Intermediary Factor 2)/ **GRIP1** (Glucocorticoid Receptor Interacting Protein 1)/**NCoA2** et **SRC-3/AIB1** (Amplified In Breast Cancer 1)/**ACTR** (acetyltransferase)/**NCoA3/p/CIP** (p300/CBP-interacting protein)/**RAC3** (Retinoic Acid Receptor-interacting protein 3)/**TRAM-1** (Throid hormone Receptor-Activated Molecule 1), **p300/CBP** (E1A-binding protein 300)/(CREB Binding Protein) et **ADA-3** (Li et al., 2010).

Ces coactivateurs p160 possèdent une **activité HAT** (Histone Acetyl Transferase) **intrinsèque** portée par leur région C-terminale. Cependant, *via* leurs domaines bHLH-PAS (basic helix-loop-helix et period [Per], Aryl hydrocarbon receptor [AhR], single-minded [Sim]) et leurs domaines d'activation AD-1 et AD-2, ils servent surtout de **plateforme** pour le recrutement d'une pléiade de facteurs appartenant à des complexes multiprotéiques avec des activités enzymatiques diverses (Figure 13) (Perissi and Rosenfeld, 2005).



Les complexes associés aux coactivateurs ont été classés en quatre groupes : (i) des complexes qui modifient covalentement les histones *via* leur activité HAT comme **pCAF** (p300/CBP associated factor), Histone Methyl Transferase (HMT) comme **CARM1** (Coactivator Associated Arginine Methyltransferase) et **PRMT1** (Protein Arginine Methyl Transferase 1) ou encore ubiquitine/deubiquitine, (ii) des complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants

comme la famille **Swi/Snf** (**S**witching **d**eficient/**S**ucose **N**on **F**ermenting) (Perissi and Rosenfeld, 2005; Yao et al., 1996) qui altèrent la structure et le positionnement des nucléosomes; (iii) des composants du complexe médiateur comme **TRAP/DRIP** (**V**itamin **D** **R**eceptor **I**nteracting **P**rotein) qui interagissent avec les facteurs généraux de la transcription (GTF : **G**eneral **T**ranscription **F**actor) et aident à l'assemblage du PIC et (iv) des coactivateurs aux fonctions encore inconnues (Privalsky, 2004).

L'ensemble de ces **coactivateurs agit de façon séquentielle et ordonnée**. Les queues N-terminales des histones sont modifiées, la chromatine est décompactée et les nucléosomes sont déplacés (Dilworth and Chambon, 2001; Perissi and Rosenfeld, 2005; Rosenfeld et al., 2006). Ensuite, les promoteurs des gènes cibles vont devenir accessibles aux GTF et à l'ARN polymérase II (ARNpolII) (Bastien and Rochette-Egly, 2004; Lefebvre et al., 2005; Rochette-Egly, 2005), permettant ainsi l'initiation de la transcription.

Ce modèle peut subir des variantes en fonction du contexte chromatinien des gènes étudiés. En effet, en absence de ligand, les promoteurs de certains gènes cibles peuvent être déjà occupés non seulement par RAR α mais aussi par le médiateur et l'ARN polymérase II (Flajollet et al., 2006; Pavri et al., 2005). Dans ce modèle, la sous-unité cdk8 (**c**yclin-**d**ependent protein **k**inase 8) du médiateur joue un rôle inhibiteur et c'est sa dissociation en réponse à l'AR qui permet l'initiation de la transcription (Andrau et al., 2006; Elmlund et al., 2006). Cependant, d'après des études récentes de CHIP à l'échelle du génome ("genome wide") des promoteurs ne seraient occupés ni par RAR α , ni par la machinerie de transcription en absence de ligand (Biddie et al., 2010; Martens et al., 2010). Leur recrutement en réponse au ligand nécessiterait alors toute une cascade de phosphorylation préliminaire (Publication 2) (cf chapitre III). Enfin, il existe de nombreux RARE très éloignés par rapport au promoteur et pour lesquels l'initiation de la transcription nécessite la création de boucles au niveau de l'ADN, permettant ainsi le rapprochement des différents acteurs intervenant dans la régulation de l'expression des gènes cibles de l'AR (Publication 2).

Finalement, comme les corépresseurs, les coactivateurs sont des cibles pour diverses PTM telles que l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, la SUMOylation et l'ubiquitination qui vont moduler leur affinité pour les RN et d'autres corégulateurs, leur localisation cellulaire, leur demi-vie et finalement la réponse à l'AR (Wu et al., 2007).

ii. Corégulateurs non conventionnels

En raison de son importance fonctionnelle, le LBD des RAR a fait l'objet d'études approfondies pour la recherche de nouveaux partenaires. Ainsi, de nombreux corégulateurs non

Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont des facteurs de transcription inductibles par le ligand

conventionnels ont été identifiés (Lefebvre et al., 2005) : (i) des coactivateurs dépourvus de motifs LXXLL et (ii) des corégulateurs à motifs LXXLL mais avec une activité répressive.

- **Corégulateurs dépourvus de motifs LXXLL**

Parmi ces corégulateurs, nous citerons :

CRABPII (Cytoplasmic Retinoic Acid Binding Protein II) qui a été initialement identifiée comme une protéine impliquée dans le transport cytoplasmique de l'AR. Cependant, cette protéine a été mise en évidence dans le noyau (Delva et al., 1999) et interagit avec RAR α . Cette interaction avec le récepteur, stabilisée par la cycline D3 (Despouy et al., 2003), augmente la fixation de l'AR et la réponse transcriptionnelle (Budhu et al., 2001; Budhu and Noy, 2002).

La **cycline H** qui interagit avec RAR α au niveau d'une surface mettant en jeu la boucle L8-9 du LBD et distincte de la surface d'interaction avec les coactivateurs. La cycline H joue un rôle d'ancrage permettant le bon positionnement de sa kinase associée, cdk7 et ainsi la phosphorylation du NTD de RAR α (Bour et al., 2005a) (cf chapitre III).

L'**actine** et les protéines liant l'actine (ABP : Actin Binding Protein) sont recrutées par les RN et participent au contrôle de la transcription (Bour et al., 2007). Dans certains cas, l'actine nucléaire participe à des interactions interchromosomales qui permettent de coupler l'initiation et l'élongation de la transcription avec la maturation des ARNm (Nunez et al., 2008) et pourrait donc être considérée comme un "coactivateur". De plus l'actine et les ABP participent au remodelage de la chromatine et à la mise en place d'un réseau d'actine favorable aux mouvements dans le noyau (Gottschalk et al., 2008).

SUG-1 (Suppressor for Gal1) qui est une sous-unité du protéasome 26S renfermant une activité ATPasique (Finley, 2009). SUG-1 interagit avec les RAR (vom Baur et al., 1996) et participe à la dégradation des RAR et de certains coactivateurs mais également à la régulation de leur activité transcriptionnelle (cf Résultats) (Gianni et al., 2002a) (Publication 1).

TACC1 (Transforming Acidic Coiled-Coil 1) qui d'après des travaux récents, interagirait avec RAR α et RXR α en absence de ligand (Guyot et al. , 2010) et jouerait un rôle d'échafaudage dans le recrutement de complexes coactivateurs.

- **Corépresseurs à motifs LXXLL**

Ces protéines présentent de grandes similitudes avec les coactivateurs de la famille p160 puisqu'elles possèdent plusieurs motifs de type LxxLL permettant leur interaction avec les RAR en

présence d'AR ou d'agonistes (Gurevich et al., 2007; White et al., 2004). Cependant, elles jouent un **rôle répresseur** *via* le recrutement de complexes répresseurs de la transcription (Figure 14) (Gurevich et al., 2007; White et al., 2004).

C'est le cas de **RIP 140** (Receptor Integrating Protein of 140 kDa) qui a initialement été identifié comme un corégulateur de ER α (Cavailles et al., 1994; Cavailles et al., 1995) et qui présente neuf motifs LXXLL. *Via* six de ces motifs, RIP140 interagit avec RAR et RXR de façon ligand dépendante (Heery et al., 2001; Wei et al., 2000) et réprime la transcription des gènes cibles de l'AR *via* le recrutement de HDAC (Farooqui et al., 2003; Lee et al., 1998; Lee and Wei, 1999; Wei et al., 2001).

De la même façon, **LCoR** (Ligand-dependent CoRepressor), **PRAME** (Preferentially expressed Antigen in Melanoma), **TIF1 α** (Transcription Intermediary Factor 1 α) interagissent *via* leur motifs LXXLL (sept dans PRAME, un dans LCoR et TIF1 α) avec les RAR en présence de ligand. Ils renferment des domaines de répression qui permettent le recrutement des corépresseurs conventionnels comme CtBP (C-terminal Binding Protein), les HDAC et les facteurs de la famille polycomb (Augereau et al., 2006; Fernandes et al., 2003; Palijan et al., 2009; Perissi et al., 2010; Wei et al., 2000).

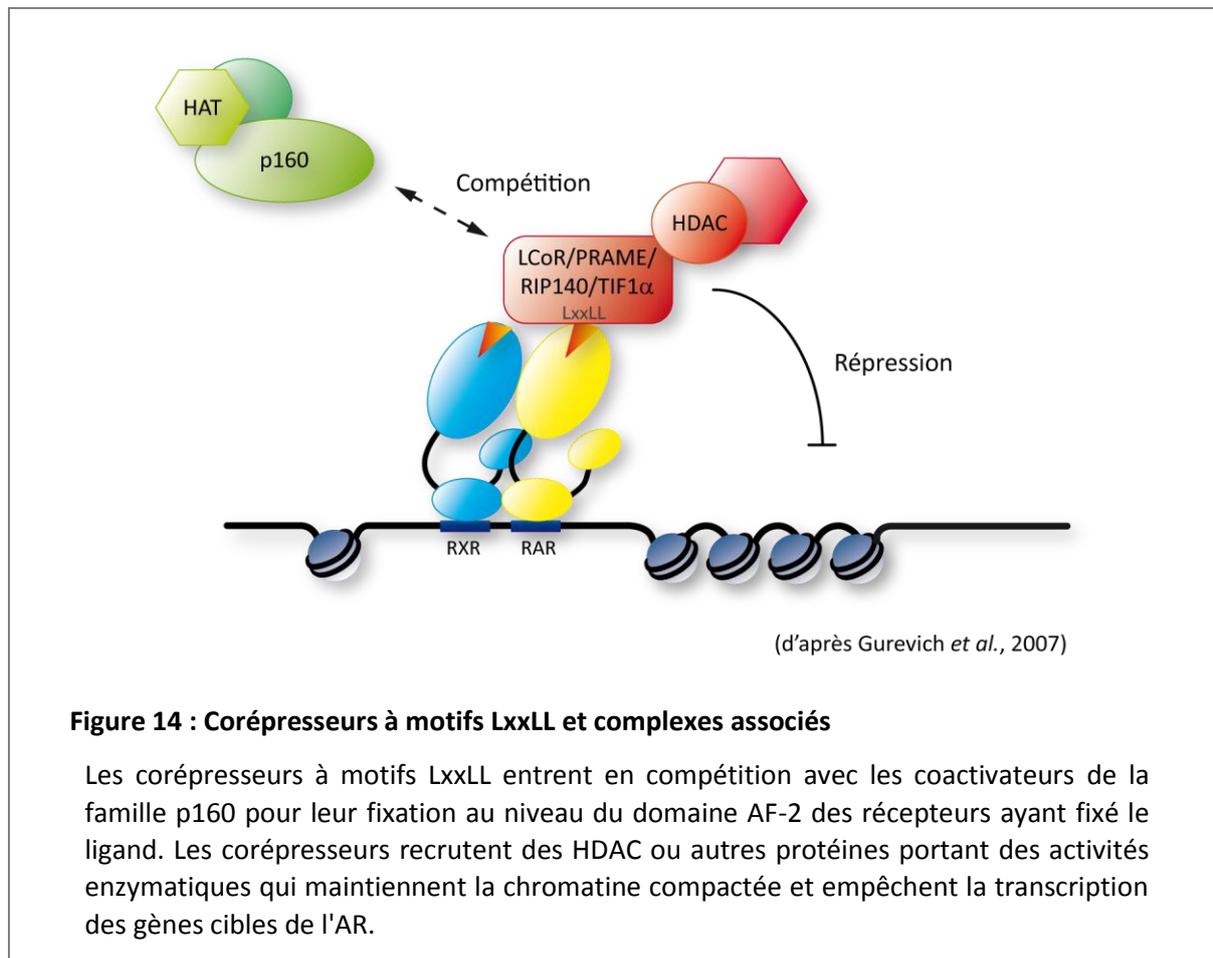


Figure 14 : Corépresseurs à motifs LxxLL et complexes associés

Les corépresseurs à motifs LxxLL entrent en compétition avec les coactivateurs de la famille p160 pour leur fixation au niveau du domaine AF-2 des récepteurs ayant fixé le ligand. Les corépresseurs recrutent des HDAC ou autres protéines portant des activités enzymatiques qui maintiennent la chromatine compactée et empêchent la transcription des gènes cibles de l'AR.

3. Association des RAR avec des ARN

a. Interaction avec des ARNm

Récemment, deux équipes ont mis en évidence un nouveau rôle de RAR α , indépendant de ses fonctions transcriptionnelles habituelles, dans des cellules neuronales (dendrites) (Chen et al., 2008; Maghsoodi et al., 2008). Dans ces cellules, l'AR participe à la plasticité synaptique en augmentant rapidement la fréquence des potentiels d'action et la libération de neurotransmetteurs au niveau des synapses (Aoto et al., 2008; Liao et al., 2004; Liou et al., 2005). Cette activité a été corrélée à une traduction rapide (de l'ordre de 5 à 10 minutes) et à l'export au niveau de la membrane plasmique de récepteurs au glutamate (GluR1) (Aoto et al., 2008; Chen and Napoli, 2008).

Ces effets, dépendants de RAR α (Chen and Napoli, 2008; Liao et al., 2004), sont trop rapides pour découler de mécanismes transcriptionnels. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que dans les neurones, RAR α est présent non seulement dans les noyaux mais aussi dans le cytoplasme (Aoto et al., 2008) au sein de granules composées d'ARNm, de protéines associées aux ARN, de sous-unité de ribosomes et de facteurs d'initiation de la traduction (Maghsoodi et al., 2008). Ces structures permettent le transport et le stockage d'ARNm puis leur traduction locale et rapide en réponse à des stimuli ou à des stress cellulaires (Knowles et al., 1996). Dans ces granules, RAR α interagirait directement *via* son domaine F et/ou l'hélice H12, avec l'extrémité 5'UTR de certains ARN, comme les ARNm codant **GluR1** et **GluR2 empêchant ainsi l'initiation de leur traduction** (Figure 15) (Chen et al., 2008; Poon and Chen, 2008). Suite à la fixation de l'AR et aux changements conformationnels du LBD, l'interaction serait interrompue permettant la traduction des ARNm codant GluR1 (Aoto et al., 2008; Chen and Napoli, 2008). L'AR et RAR α joueraient donc un rôle clé dans la plasticité synaptique *via* la régulation de la traduction d'ARNm (Aoto et al., 2008).

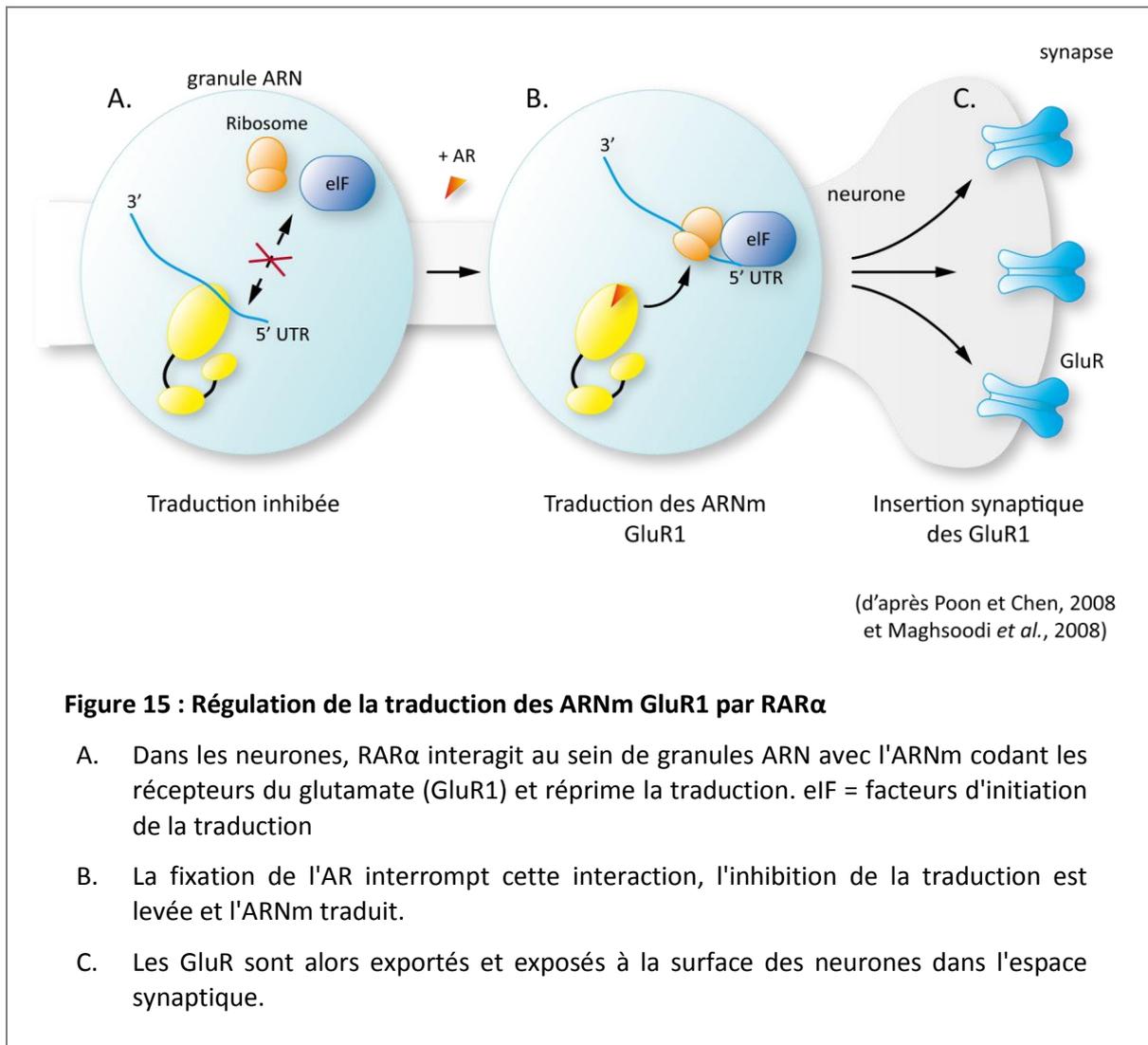


Figure 15 : Régulation de la traduction des ARNm GluR1 par RAR α

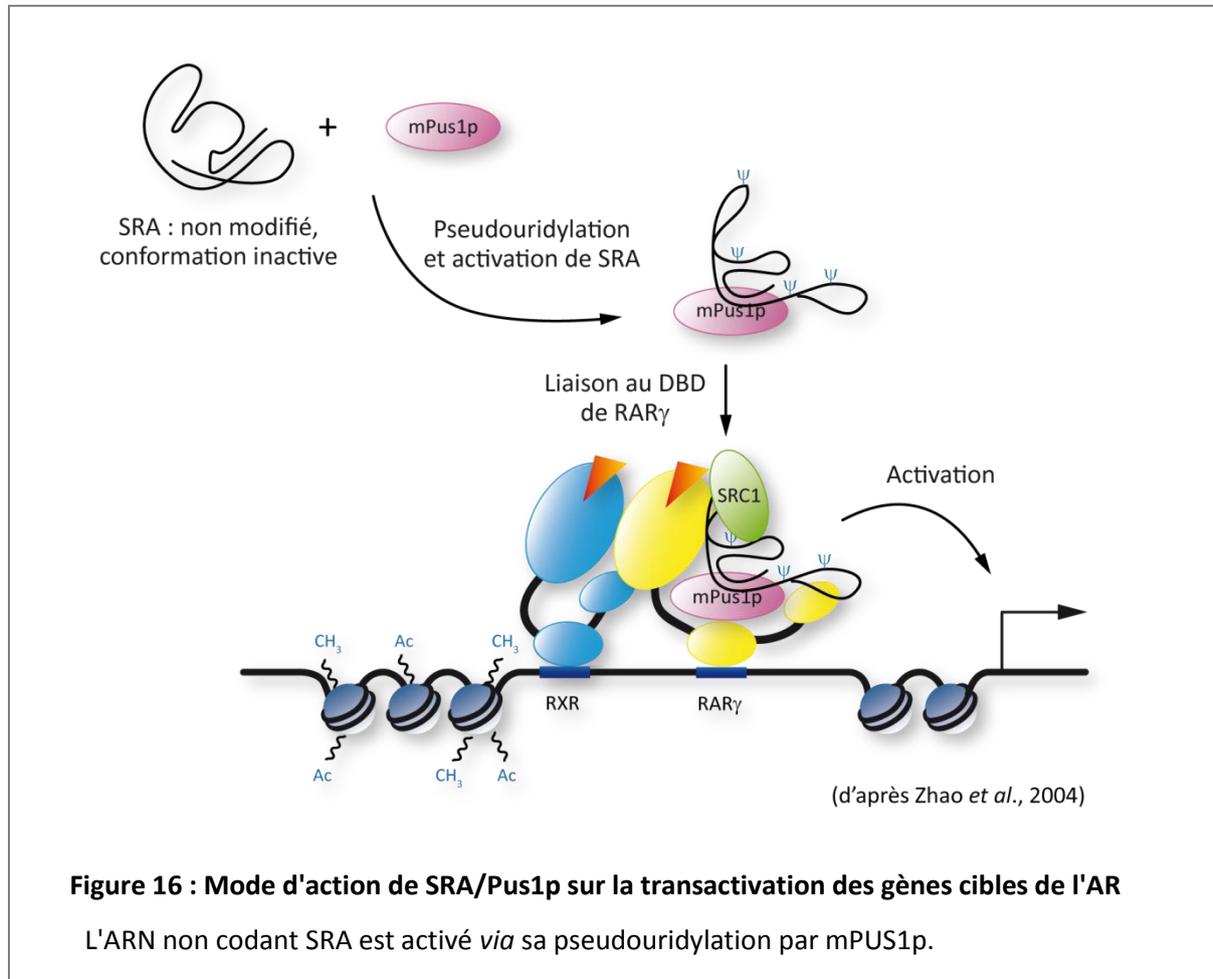
- Dans les neurones, RAR α interagit au sein de granules ARN avec l'ARNm codant les récepteurs du glutamate (GluR1) et réprime la traduction. eIF = facteurs d'initiation de la traduction
- La fixation de l'AR interrompt cette interaction, l'inhibition de la traduction est levée et l'ARNm traduit.
- Les GluR sont alors exportés et exposés à la surface des neurones dans l'espace synaptique.

b. Interaction avec des ARN non codants

L'implication d'ARN non codants ou de protéines fixant des ARN dans le fonctionnement des RAR a été suggérée depuis quelques années (Barrandon *et al.*, 2008). En effet, l'équipe du Pr. O'Malley a mis en évidence un nouveau corégulateur ARN : **SRA** (**S**teroid **R**eceptor **R**NA **A**ctivator) (Lanz *et al.*, 1999) qui participerait à la transactivation des gènes cibles de la plupart des RN. SRA interagirait avec les RN soit directement (TR) (Xu and Koenig, 2004) soit indirectement (ER, PR et RAR) (Colley and Leedman, 2009) *via* des contacts avec d'autres coactivateurs comme SRC-1 (Zhao *et al.*, 2004).

Cependant, le mode d'action de SRA reste flou. En effet, bien que jouant majoritairement un rôle coactivateur en tant qu'échafaudage au sein de différents complexes protéiques (Hatchell *et al.*, 2006), SRA jouerait aussi un rôle corépresseur lorsqu'il est associé à des protéines telles que SHARP (**S**MRT/**H**DAC **A**ssociated **R**epressor **P**rotein) (Shi *et al.*, 2001) et SLIRP (**S**RA stem-**L**oop **I**nteracting **R**NA binding **P**rotein) (Hatchell *et al.*, 2006).

Dans le contexte de RAR γ , SRA interagirait indirectement avec le premier doigt de zinc du DBD du récepteur *via* deux pseudouridine synthases **Pus1p** et **Pus3p** (Figure 16) (Zhao et al., 2004; Zhao et al., 2007). Les modifications de SRA induites par Pus1 et Pus3, aiguilleraient certaines interactions avec les corégulateurs et dirigerait SRA soit vers un rôle coactivateur soit corépresseur (Zhao et al., 2007).



Il a également été démontré que les RAR ont la capacité de se lier à des homopolymères d'ARN *via* leur LBD, mais la fonctionnalité de cette interaction reste encore évasive (Lalli et al., 2000).

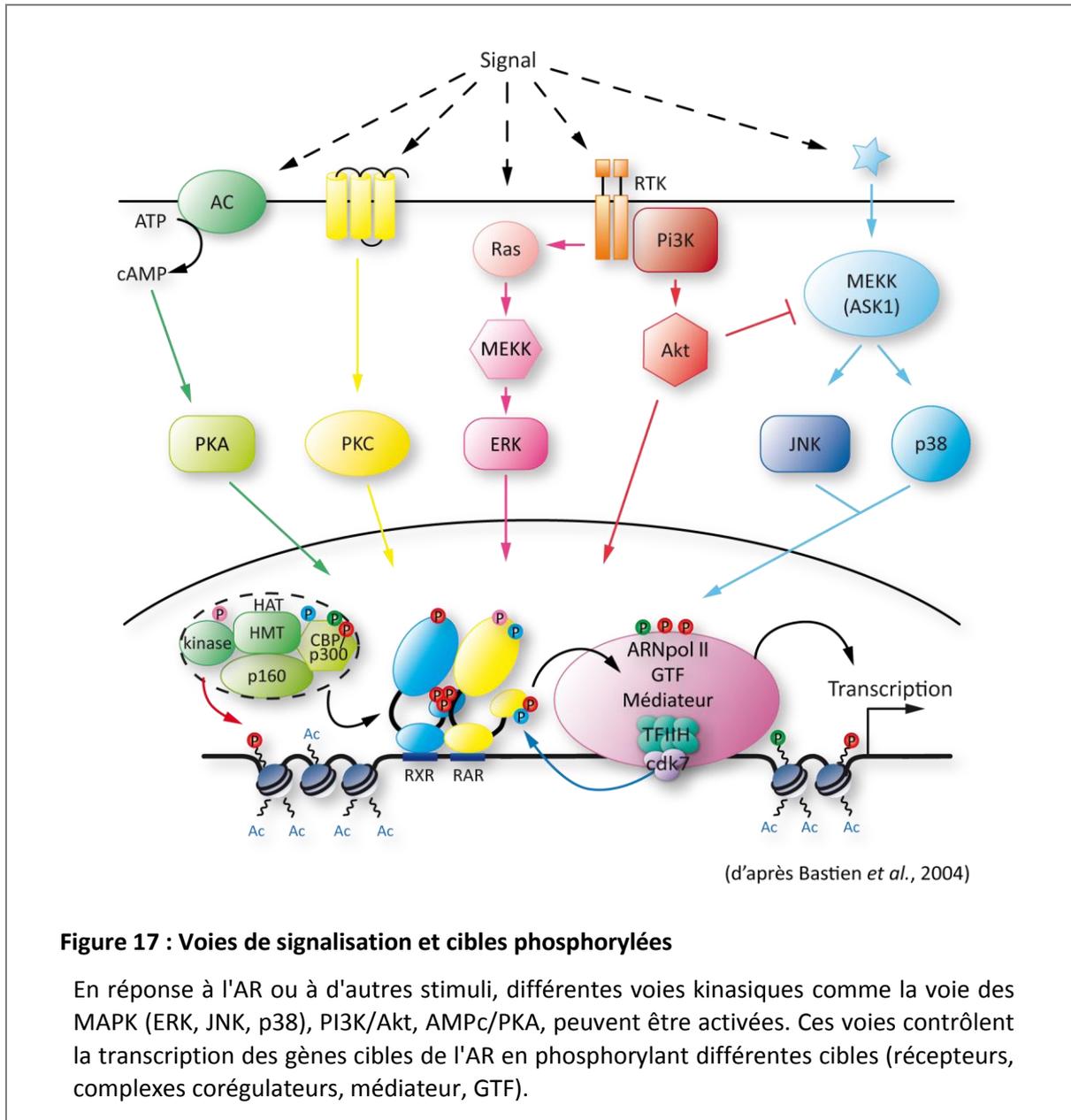
Enfin comme décrit dans le paragraphe I.B.1.c, Acinus S', un nouveau partenaire du NTD de RAR β (Vucetic et al., 2008) a également été trouvé associé à des complexes impliqués dans la maturation des ARN, notamment le complexe ASAP (Apoptosis Splicing Associated Protein) (Schwerk et al., 2003) ainsi que dans le complexe de Jonction Exon/Exon (EJC) (Tange et al., 2005).

Ces données établissent un lien entre la régulation de **l'expression des gènes et la maturation des ARN**.

II. Nouvelles activités des RAR : interférences des RAR et de l'AR avec les voies de signalisation

Depuis longtemps, l'AR est connu pour sa capacité non seulement à inhiber la prolifération des cellules et à induire leur différenciation mais aussi à activer des cascades de kinases. Cependant, ces effets relativement tardifs mettent en jeu **l'activité transcriptionnelle des RAR**, c'est le cas de l'induction des sous-unités p110 β et p85 α de la kinase PI3K (PhosphoInositide 3-Kinase) ou les kinases PKC α et β (Protéine Kinase C) (Bastien et al., 2006; Kambhampati et al., 2003; Lopez-Carballo et al., 2002; Uruno et al., 2005). En effet, les promoteurs des gènes codant p85 et PKC α renferment un DR5 (Bastien et al., 2006; Bastien and Rochette-Egly, 2004).

Récemment, il a été démontré par plusieurs laboratoires, dont celui du Dr. Cécile Rochette-Egly, que l'AR induit très rapidement (dans les minutes qui suivent son addition) des cascades de kinases *via* des effets non génomiques. Parmi ces cascades kinasiques, les MAPK et la voie PI3K/Akt ont fait l'objet de nombreux travaux (Figure 17). En effet, la voie **MAPK/ERK** impliquée dans la différenciation et la survie cellulaire est activée quelques minutes après l'addition d'AR dans de nombreux types cellulaires : cellules embryonnaires (ES, P19) (Bost et al., 2002; Gupta et al., 2008), cellules épithéliales tumorales (Aggarwal et al., 2006; Pasquali et al., 2005; Yen et al., 1998), cellules germinales (Zanotto-Filho et al., 2008), cellules nerveuses (Alique et al., 2006; Canon et al., 2004; Chen and Napoli, 2008). Selon les travaux récents de l'équipe, la voie de la **p38MAPK/MSK1** est aussi activée dans plusieurs systèmes cellulaires : cellules de cancer du sein (MCF7) (Publication 2), fibroblastes embryonnaires (MEF) (Publication 2), carcinomes embryonnaires (F9) et cellules leucémiques (NB4) (Alsayed et al., 2001). Enfin, une activation de la voie **PI3K/Akt** a été observée dans diverses lignées cellulaires : neuroblastomes (Lopez-Carballo et al., 2002; Masia et al., 2007), fibroblastes (Masia et al., 2007) et carcinomes embryonnaires (F9) (Bastien et al., 2006) (Figure 17).



Comment l'AR active les différentes voies de signalisation reste encore à définir. Cependant, de plus en plus de travaux tendent à montrer que les RAR sont impliqués indépendamment de leur activité transcriptionnelle. En effet, une forme des RAR localisée au niveau de la membrane plasmique serait impliquée dans le processus. En effet, des expériences de microscopie confocale et de fractionnement effectuées par différents laboratoires (Chen and Napoli, 2008; Masia *et al.*, 2007) dont celui du Dr. Cécile Rochette-Egly (Piskunov *et al.*, manuscrit en préparation) montrent qu'une faible proportion de RAR est présente au niveau de la **membrane plasmique** associée aux **Raft**.

D'après certains travaux, les RAR formeraient un complexe stable avec la sous-unité régulatrice p85 de **PI3K** (Figure 18b) (Lopez-Carballo *et al.*, 2002; Masia *et al.*, 2007; Ohashi *et al.*,

2009) ou interagiraient *via* le motif riche en prolines du NTD avec le domaine SH3 de la kinase **src** aboutissant à l'activation de la GTPase **RAC1** en aval (Figure 18a) (Dey et al., 2007).

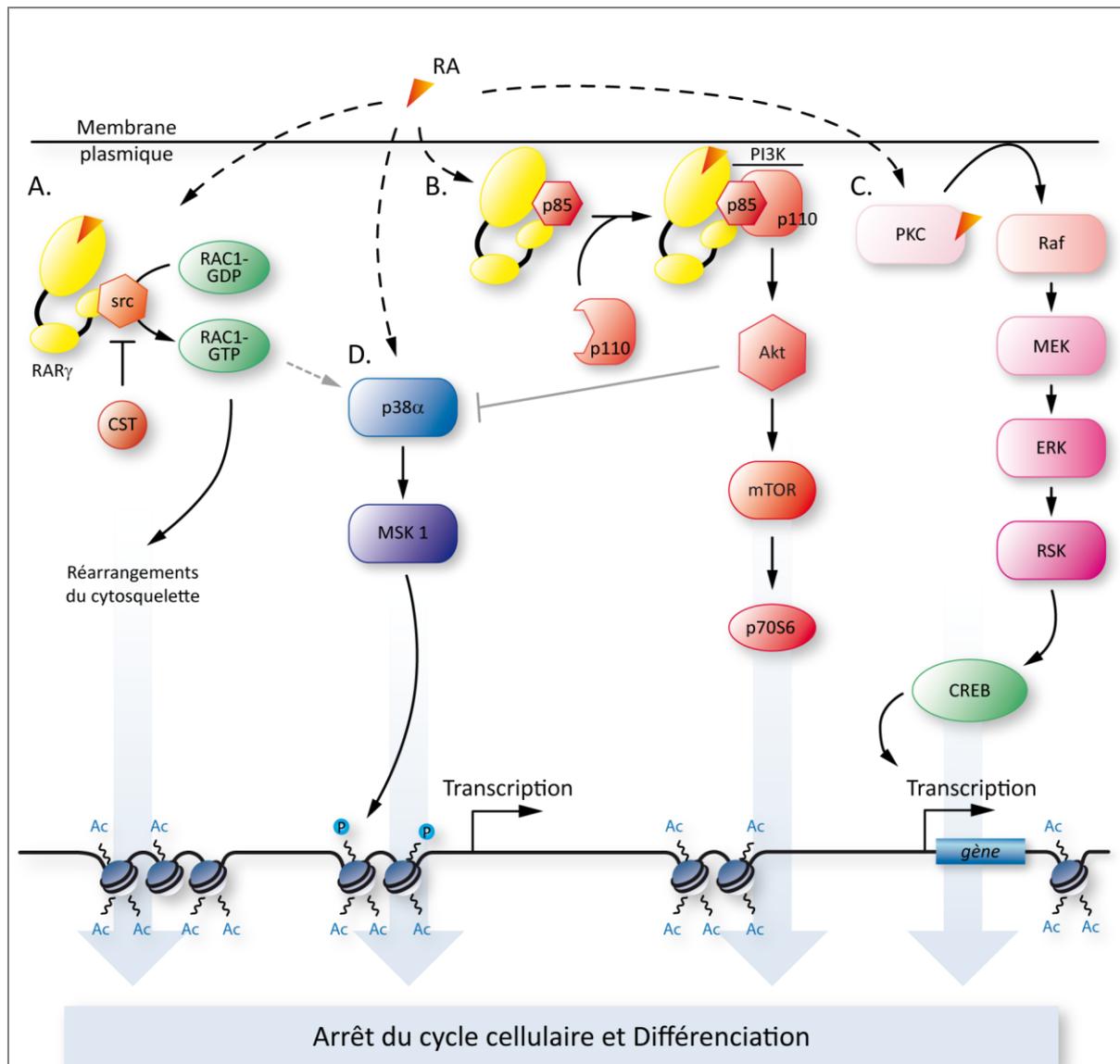


Figure 18 : Activation des voies kinasiques et effets non génomiques de l'AR

L'AR induit des effets non génomiques *via* l'activation de kinases indépendamment (C. et D.) ou non (A. et B.) des RAR mais qui *in fine* peuvent converger vers des effets génomiques. Des interférences (flèches grises) peuvent aussi avoir lieu entre les différentes voies kinasiques. A. Dey et al., 2007 B. Masia et al., 2007 C. Aggarwal et al., 2006; Kim et al., 2007b; Lopez-Andreo et al., 2005 D. Publication 2, Chai et al., 2009; Gianni et al., 2006 .

De façon intéressante, l'équipe du Dr. Cécile Rochette-Egly a montré que suite à son activation par l'AR, la p38MAPK a comme cible une autre kinase : **MSK1** (**M**itogen- and **S**tress-activated **K**inase **1**) (Figure 18d) (Publication 2). MSK1 est essentiellement nucléaire et serait activée

aussi bien par la p38MAPK que par les ERK. Elle est composée de deux domaines kinasiques reliés par un "linker". Le domaine C-terminal de MSK1 interagit avec la p38MAPK ou avec les ERK qui le phosphorylent sur une sérine, activant la fonction kinasique du domaine (Deak et al., 1998). Ce dernier phosphoryle alors le domaine N-terminal impliqué dans la phosphorylation des substrats (Vicent et al., 2006).

Parmi les substrats de MSK1, on distingue les **histones** (Figure 18d), des facteurs de transcription (CREB (Cyclic AMP Response Element Binding), NF- κ B (Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3) et STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) (Ordonez-Moran and Munoz, 2009; Roux and Blenis, 2004; Vermeulen et al., 2009) et les récepteurs nucléaires comme PR (Vicent et al., 2006) et RAR (Publication 2). En outre, des expériences de co-immunoprécipitation de la chromatine ont montré que MSK1 est recrutée au niveau des promoteurs des gènes cibles de RAR α et de PR afin de phosphoryler les histones (Publication 2) (Vicent et al., 2006).

En effet, **les histones H3** sont une cible pour la kinase MSK1 qui les phosphoryle sur la **sérine 10** (Soloaga et al., 2003) (Publication 2). Cette modification est couplée à l'acétylation ainsi qu'à d'autres modifications des histones et participe ainsi au code histone et à l'activation de la transcription (Cheung et al., 2000; Lo et al., 2000). *In fine*, cette phosphorylation contribue à la relaxation de la chromatine (Dunn et al., 2005; Vermeulen et al., 2009) permettant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle.

A noter que dans certaines lignées cellulaires, ce schéma faisant intervenir les RAR dans l'activation des kinases n'est pas transposable. En effet, l'activation des MAPK par l'AR n'est pas affectée par l'utilisation d'antagonistes des RAR ou l'utilisation de siRNA dirigés contre ces récepteurs (Aggarwal et al., 2006; Kim et al., 2007b; Liao et al., 2004). Cette activation des kinases passerait par un autre mécanisme indépendant des RAR faisant intervenir les **PKC**. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de la PKC entraîne une inactivation des ERK (Aggarwal et al., 2006; Nakagawa et al., 2003). En parallèle, des données cristallographiques du complexe PKC/AR montrent que la PKC α peut fixer l'AR (Ochoa et al., 2003; Radominska-Pandya et al., 2000) et que son activité en est modulée (Lopez-Andreo et al., 2005). Plus précisément, l'AR se fixe préférentiellement sur le domaine C2 de la PKA α et entraîne une translocation de la kinase au niveau des membranes perinucléaire et plasmique. Cette dernière localisation permet l'activation de la voie Raf/MEK/ERK/RSK/CREB conduisant *in fine*, à l'expression des gènes sous le contrôle de CREB (Figure 18c) (Aggarwal et al., 2006; Kim et al., 2007b).

En conclusion, selon le type cellulaire, des voies kinasiques différentes sont activées en réponse à l'AR. De plus, ces voies peuvent interférer entre elles : inhibition des voies p38MAPK et JNK (c-Jun NH2-terminal Kinase) et activation de la voie MAPK/ERK (Bost et al., 2002; Shinozaki et al., 2007; Yen et al., 1999), inhibition de PI3K/Akt et activation de la p38MAPK (Figure 18) (Gianni et al., 2002b). Ces interdépendances et ces spécificités cellulaires pourraient en partie expliquer la diversité des réponses cellulaires (différenciation, prolifération, apoptose) observées en présence d'AR. Etant donné la rapidité de l'activation des cascades par l'AR et la localisation des RAR, la réponse à l'AR est transmise par des mécanismes indépendants de la transcription, au niveau du cytoplasme et/ou de la membrane plasmique, dépendants ou non des RAR (Alsayed et al., 2001; Bruck et al., 2009; Canon et al., 2004; Liao et al., 2004; Valverde and Parker, 2002).

III. Les RAR et leur coactivateur SRC-3 sont des phosphoprotéines

Selon le type cellulaire et les voies impliquées, de nombreuses protéines peuvent être les cibles des kinases activées par l'AR, telles que des protéines associées au cytosquelette ou à la membrane (Zhu et al., 1999b), des protéines impliquées dans l'épissage (Laserna et al., 2009), des facteurs généraux de transcription (Aggarwal et al., 2006; Canon et al., 2004; Kim et al., 2007b) et les histones (Publication 2). Les récepteurs nucléaires eux-mêmes et leurs corégulateurs dont SRC-3, sont également des cibles de ces kinases (Perissi et al., 2008).

A. Sites de phosphorylation des RAR, des RXR et de SRC-3

1. RAR

Certaines kinases abordées précédemment phosphorylent les RAR en réponse à l'AR. Des sites ont été identifiés au sein des différents domaines, notamment dans le NTD et le LBD (Tableau 2). Nous ne nous intéresserons qu'aux sites phosphorylés en réponse à l'AR et modulant l'activité transcriptionnelle des RAR.

Le NTD des RAR contient plusieurs sites consensus pour des kinases de type Cdk ou MAPK (Tableau 2). Ces sérines (**S77** pour RAR α , **S79** pour RAR γ 1 ou **S68** pour RAR γ 2) entourées de prolines sont phosphorylées par la kinase **cdk7** qui forme avec la cycline H et MAT1 (Ménage A Trois 1) le complexe ternaire CAK (Cdk Activating Complex), sous-complexe du facteur général de transcription TFIIH (Bastien et al., 2000; Rochette-Egly et al., 1997). Le sous-type RAR γ est également phosphorylé par la p38MAPK au niveau d'une **sérine adjacente** (**S77** pour RAR γ 1 ou **S66** pour RAR γ 2) appartenant à ce même motif riche en prolines (Gianni et al., 2002a; Gianni et al., 2002b).

Le LBD renferme lui aussi des sites de phosphorylation (Tableau 2). De façon tout à fait intéressante, la boucle L9-10, très flexible et non structurée, renferme une sérine (**S369** pour RAR α , **S371** pour RAR γ 1 ou **S360** pour RAR γ 2) au sein d'un motif riche en arginines et en lysines, correspondant à un site consensus de phosphorylation pour plusieurs kinases dont la PKA (dépendante de l'AMPcyclique), Akt (proteïn kinase B), p70S6 et MSK1 (Gaillard et al., 2006; Rochette-Egly et al., 1995) (Publication 2). Ceci suggère que ce site pourrait intégrer des signaux provenant de diverses voies de signalisation.

Ces sites de phosphorylation ont été identifiés dans le cas des sous-types α et γ de RAR. Cependant dans le cas de RAR β , il reste à définir si ces sites sont phosphorylables et en réponse à quels stimuli.

Récepteur	Domaine/Région	Résidus	Kinases	Références
RAR α	NTD	S77	cdk7/cycH (TFIIH)	Rochette-Egly <i>et al.</i> , 1997
	DBD	S96	Akt	Srinivas <i>et al.</i> , 2006
		S115	PKC	Sun <i>et al.</i> , 2007
		S157	PKC	Delmotte <i>et al.</i> , 1999
		T181	JNK	Srinivas <i>et al.</i> , 2005
	Charnière		CAMKII γ	Si <i>et al.</i> , 2007
LBD	S369	PKA/MSK1	Rochette-Egly <i>et al.</i> , 1995 Bruck <i>et al.</i> , 2009	
	Région F	S445, S461	JNK, cdk7	Rochette-Egly <i>et al.</i> , 1997 Srinivas <i>et al.</i> , 2005
RAR β 2	NTD			Rochette-Egly <i>et al.</i> , 1992
RAR γ 2	NTD	S66	p38MAPK	Bastien <i>et al.</i> , 2000
		S68	cdk7/cycH (TFIIH)	Gianni <i>et al.</i> , 2002
	LBD	S360	PKA/MSK1?	Rochette-Egly <i>et al.</i> , 1995

Tableau 2 : Domaines et sites de phosphorylation des RAR et kinases associées

2. RXR

Au laboratoire, il a été démontré que le partenaire d'hétérodimérisation RXR est aussi phosphorylé au niveau de plusieurs résidus localisés dans le NTD et le LBD (Tableau 3) (Adam-Stitah *et al.*, 1999; Bastien *et al.*, 2002).

Le NTD de RXR renferme quatre sites de phosphorylation. L'un (S22) est phosphorylé de **façon constitutive** par des Cdk et participe à l'activité antiproliférative de l'AR (Bastien *et al.*, 2002). Les trois autres sites (S61, S75 et T87) sont phosphorylés par des MAPK en réponse à l'AR et **participent à l'activité transcriptionnelle de RXR** (Bruck *et al.*, 2005; Gianni *et al.*, 2003).

Quant au LBD, il peut être phosphorylé au niveau de la sérine 265 par des MAPK. La phosphorylation de ce résidu aurait un rôle inhibiteur (Bruck *et al.*, 2005).

Récepteur	Domaine/Région	Résidus	Kinases	Références
RXR α 1	NTD	S22	cdk/cyc	Bastien <i>et al.</i> , 2002
		S32	JNK	Mann <i>et al.</i> , 2005
		S61, S75, T87	JNK	Adam-Stitah <i>et al.</i> , 1999 Bruck <i>et al.</i> , 2006
	DBD	T162	PKC	Sun <i>et al.</i> , 2007
LBD		S265	JNK	Adam-Stitah <i>et al.</i> , 1999 Bruck <i>et al.</i> , 2006 Zimmerman <i>et al.</i> , 2006
		Y248, Y397	MKK4/SEK1	Lee <i>et al.</i> , 2000

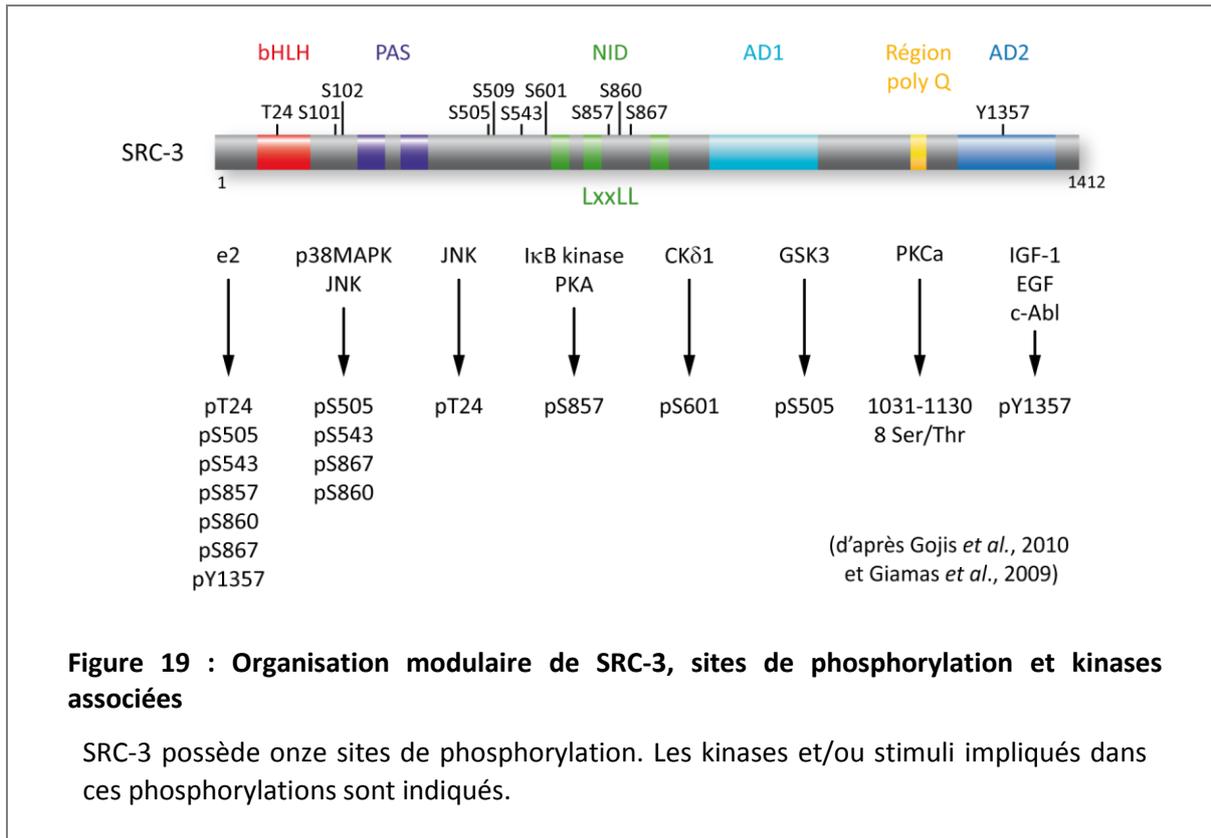
(d'après Rochette-Egly, 2003)

Tableau 3 : Sites de phosphorylation des RXR et kinases associées

3. SRC-3

Le coactivateur SRC-3 possède **onze sites de phosphorylation : T24, S101, S102, S505, S509, S543, S601, S857, S860, S867 et Y1357** (Figure 19) (Gojis *et al.*, 2010; Giamas *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2007) mis en évidence dans le contexte des œstrogènes (E2). Ainsi, en réponse à E2, ces résidus sont phosphorylés par diverses kinases telles que ERK1/2, JNK, p38MAPK, IKK α (Ik-B Kinase), CK1 δ (Casein Kinase 1 δ) et Abl1 (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) (Giamas *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2004b). A noter qu'une quinzaine de phosphatases peuvent déphosphoryler SRC-3 (Li *et al.*, 2008).

SRC-3 renferme quatre sérines **505, 543, 860 et 867** appartenant à des sites consensus pour la p38MAPK (Wu *et al.*, 2007). Au laboratoire, il a été montré que SRC-3 est phosphorylé en réponse à l'AR suite à l'activation de la p38MAPK (Gianni *et al.*, 2006). Cette phosphorylation régule spécifiquement **l'interaction avec le récepteur RAR α** et participe ainsi à **l'activité transcriptionnelle de RAR α** . Elle participe aussi à la dégradation du coactivateur (Gianni *et al.*, 2006). Cependant, peu de choses sont connues quant aux mécanismes de ces phosphorylations. De plus, rien n'indique que les modèles proposés dans le contexte des œstrogènes par l'équipe du Pr. O'Malley sont transposables aux rétinoïdes.

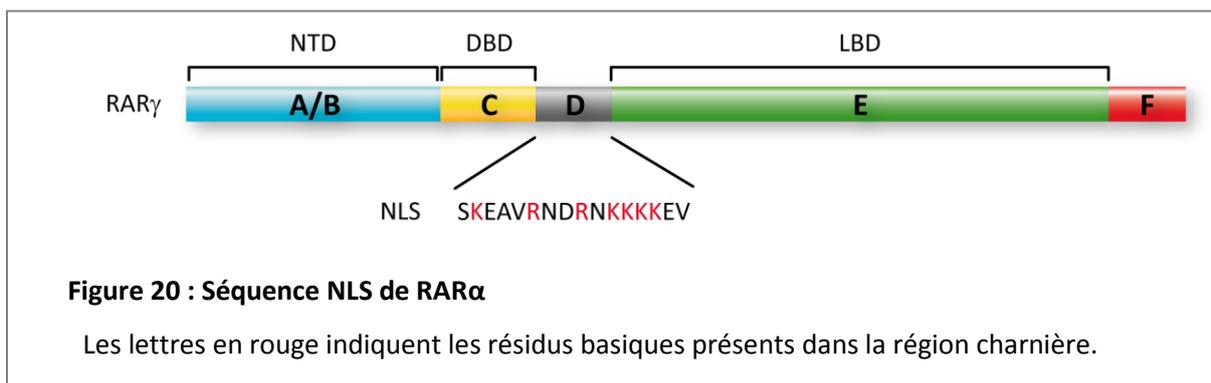


B. Rôles de la phosphorylation dans la réponse à l'AR

1. Rôles de la phosphorylation des RAR (pour revue Publication 4)

a. Localisation intracellulaire des RAR

De manière générale, les RAR sont majoritairement nucléaires. Cependant, des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) ont montré qu'il existe un équilibre entre les localisations nucléaires et cytoplasmiques des RAR et des RXR (Dong *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2006; Maruvada *et al.*, 2003). La localisation intracellulaire des RAR est régulée par différents facteurs. Des protéines de types Importines α/β reconnaissent la séquence **NLS** (Nuclear Localization Signal) présente dans la région charnière et facilitent son transport dans le noyau (Hamy *et al.*, 1991; Mezaki *et al.*, 2009) (Figure 20).



Le ligand, certains partenaires comme CART1 (Cytoplasmic Adaptor for RAR and TR) (Park et al., 2010) et le partenaire d'hétérodimérisation RXR jouent aussi un rôle clé dans l'import nucléaire des RAR (Han et al., 2009b; Maruvada et al., 2003; Prufer and Barsony, 2002). De manière intéressante, les modifications post-traductionnelles contrôleraient également la localisation intracellulaire des RAR (Braun et al., 2002; Han et al., 2009a; Sun et al., 2007; Tahayato et al., 1993). En effet, suite à la phosphorylation du NTD par la p38MAPK, à son hétérodimérisation et à la fixation du ligand, RAR γ est transporté dans le noyau (Han et al., 2009b). D'après Braun *et al.*, dans les cellules de Sertoli, l'activation de la PKC puis des MAPK entraînerait la translocation de RAR α dans le noyau (Braun et al., 2000; Braun et al., 2002).

b. Association/dissociation de corégulateurs au niveau du NTD

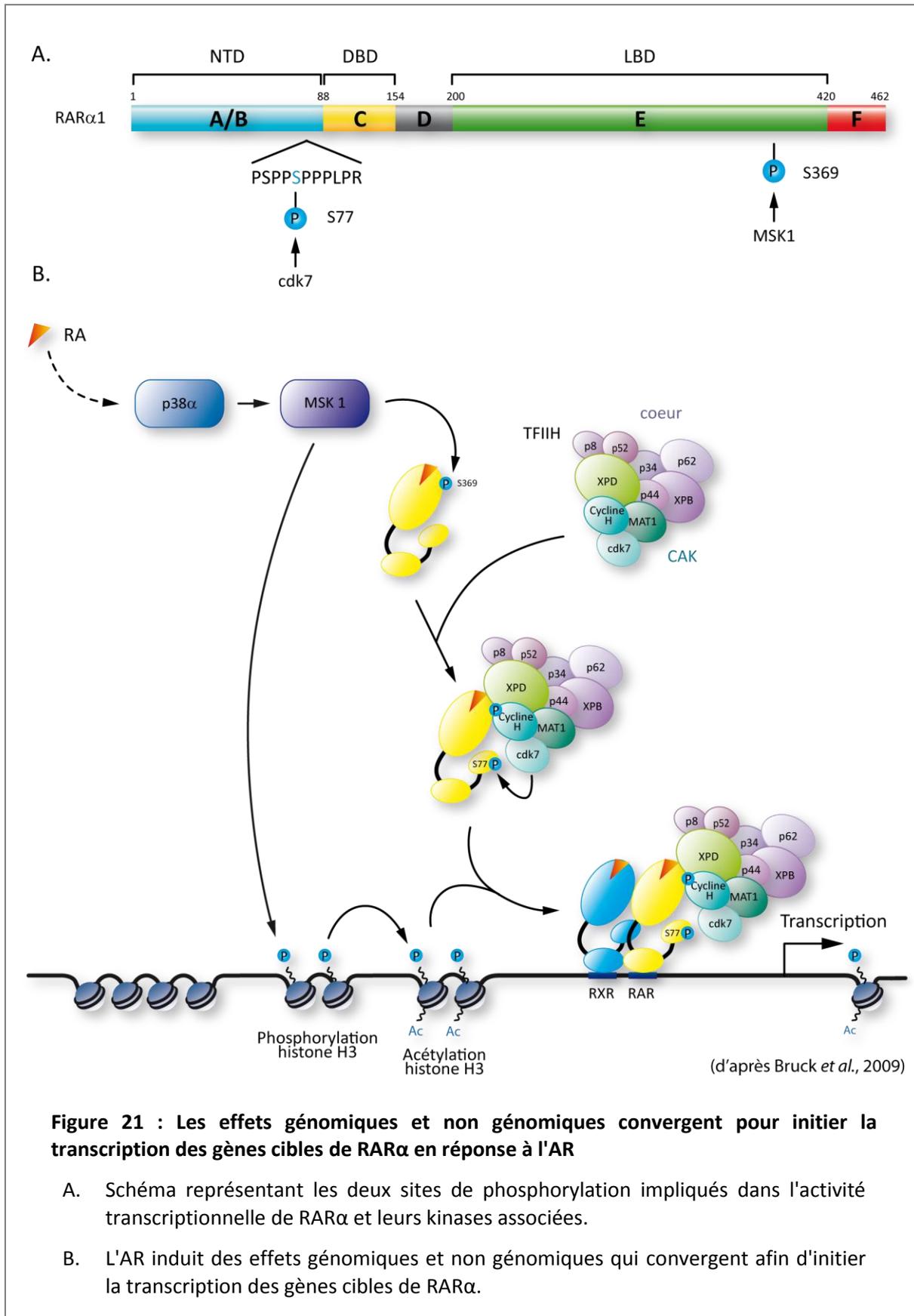
Les résidus phosphorylables du NTD des RAR sont situés au sein d'un motif riche en prolines qui peut interagir avec des protéines renfermant des domaines **SH3** (Li, 2005) ou **WW** (Kay et al., 2000a). Par conséquent, la **phosphorylation de ces résidus peut favoriser ou inhiber des interactions** (Kay et al., 2000b; Macias et al., 2002; Sudol et al., 2001; Zarrinpar and Lim, 2000). Ainsi au laboratoire, il a été démontré que l'interaction du NTD de RAR γ avec le troisième domaine SH3 de la vinexine β n'a lieu qu'en absence de phosphorylation. Puis, la phosphorylation du NTD induit la dissociation de la vinexine β (Bour et al., 2005b; Lalevee et al., 2010). Cette dissociation a un effet positif sur la transcription puisqu'elle induit le départ d'un répresseur (Bour et al., 2005b; Lalevee et al., 2010). Par contre dans le contexte de RAR α , la phosphorylation du NTD favorise l'interaction avec Pin1 (Peptidyl-Prolyl Isomerase 1), une protéine à domaines WW (Brondani et al., 2005). Ici, cette interaction régulerait négativement l'activité de RAR α en induisant sa dégradation (Brondani et al., 2005; Gianni et al., 2009).

Ainsi, en modulant les interactions des RAR avec des corégulateurs, les phosphorylations permettraient de passer rapidement d'un état transcriptionnel répresseur à un état actif et réciproquement.

c. Recrutement à l'ADN

Au laboratoire, il a été montré que *in vivo*, suite à l'activation de la voie p38MAPK/MSK1 par l'AR, la phosphorylation de la sérine 369 de RAR α **initie une cascade de phosphorylation et de recrutements de complexes protéiques** (Publication 2). La sérine 369 est localisée dans la boucle L9-10 du LBD, à proximité du site d'ancrage de la cycline H (Figure 21) (Gaillard et al., 2006) (Publication 2). La phosphorylation de ce résidu induit des changements conformationnels qui vont

favoriser la fixation de la cycline H et par voie de conséquence le bon positionnement de la kinase cdk7 conduisant à la phosphorylation de la sérine 77 du NTD (Bour et al., 2005a; Gaillard et al., 2006).



En parallèle, la kinase MSK1 phosphoryle la sérine 10 des histones H3 (Lefebvre et al., 2002; Vicent et al., 2008). Cette modification entraîne l'acétylation de la lysine 14 des mêmes histones (Cheung et al., 2000; Lo et al., 2000), le recrutement des complexes de remodelage SWI/SNF selon le code histone puis la relaxation de la chromatine (Vicent et al., 2009) (Publication 2).

Ces deux cascades d'évènements (phosphorylation de RAR α et des histones) **permettent le recrutement de RAR α** au niveau des RARE et **l'initiation de la transcription des gènes cibles** (Publication 2). Ces cascades ont été mises en évidence dans le cas de RAR α et il reste à déterminer si elles sont transposables aux autres RAR.

Il est à noter que la phosphorylation de la sérine 77 joue un rôle clé dans la transcription des gènes cibles de l'AR (Bastien et al., 2000; Boudjelal et al., 1997; Rochette-Egly et al., 1997; Rochette-Egly et al., 2000). De plus, la phosphorylation de la sérine 77 conduit à la transactivation ligand-indépendante par RAR α de gènes sous le contrôle du promoteur *pfgf8* (Brondani et al., 2005). Enfin, dans des fibroblastes issus de patients atteints de la maladie Xeroderma Pigmentosum, caractérisée par une mutation au niveau d'une sous-unité (XPD (Xeroderma Pigmentosum group D-complementing protein)) du complexe TFIIH, RAR α est **hypophosphorylé au niveau de la sérine 77 et la réponse à l'AR est inhibée** (Keriel et al., 2002). A présent, il reste à élucider comment la phosphorylation du NTD du récepteur peut influencer son recrutement au niveau de l'ADN et/ou le recrutement de partenaires afin d'initier la transcription des gènes cibles.

2. Rôles de la phosphorylation de SRC-3

Les rôles de la phosphorylation de SRC-3 en réponse à l'AR commencent seulement à être décryptés. Néanmoins, dans le contexte des œstrogènes, des modèles de régulation et d'interdépendance entre les différentes phosphorylations et/ou autres PTM du coactivateur ont été proposés. Une approche protéomique a permis de mettre en évidence une quarantaine de PTM pour la plupart interdépendantes (O'Malley et al., 2008). **Le code formé par les différentes combinaisons de ces modifications permet d'intégrer de multiples signaux et conduit à la formation de complexes protéiques de composition variable, impliqués dans des interactions avec des corégulateurs/récepteurs ou dans la localisation intracellulaire de SRC-3** (Tableau 4) (Lonard and O'Malley, 2006; Wu et al., 2004b; Yu et al., 2007). En règle générale, la phosphorylation joue un rôle clé dans l'activation de SRC-3 ; son hypophosphorylation est souvent corrélée à un état inactif, à l'inverse, son hyperphosphorylation correspondant à un état actif (Lonard et al., 2007; Wu et al., 2007; Wu et al., 2004b).

Résidus	Kinases et enzymes	Modification(s) associée(s)	Rôles	Références
T24, S857, S860	voie EGF		Translocation nucléaire	Amazit <i>et al.</i> , 2007
? C-terminal	aPKC/PKC ξ		Inhibition de l'interaction avec le protéasome, stabilisation	Yi <i>et al.</i> , 2008
S505, S509	GSK3 β /Fbw7 α	Ub K723, K786	Activation, dégradation	Wu <i>et al.</i> , 2007
S505, S543, S860, S867	p38MAPK		Activation, dégradation	Gianni <i>et al.</i> , 2006
S601	CK1 δ		Activation, stabilisation	Giamas <i>et al.</i> , 2009
Y1357	Abl1		Régulation de l'interaction avec ER, p300 et CARM1, activation	Oh <i>et al.</i> , 2008
?	IKK		Activation	Wu <i>et al.</i> , 2002
?	?/Pin1	Isomérisation Pro	Changements conformationnels, activation, dégradation	Yi <i>et al.</i> , 2005
S101, S102	PP1		Déphosphorylation, stabilisation	Li <i>et al.</i> , 2008
	PP2A, PDXP		Déphosphorylation, suppression	Li <i>et al.</i> , 2008

Tableau 4 : Phosphorylations de SRC3, kinases et PTM associées

En réponse à l'AR et à E2, SRC-3 est phosphorylé par différentes kinases (en noir). Ces phosphorylations peuvent être couplées à d'autres PTM et induire différents effets. Elles sont également régulées par des phosphatases (en bleu).

a. Phosphorylation de SRC-3 en réponse à divers stimuli

La phosphorylation de SRC-3, en réponse à divers stimuli (TNF α (Tumor Necrosis Factor α), EGF (Epidermal Growth Factor), E2), régule de nombreuses fonctions du coactivateur et notamment sa **localisation** (Amazit *et al.*, 2007; Coste *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2002). Ainsi, le coactivateur oscille entre le noyau où il joue son rôle de coactivateur des RN (Figure 22b) et le cytoplasme où il peut être impliqué dans la régulation de la traduction (Yu *et al.*, 2007) ou la régulation des EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Lahusen *et al.*, 2007).

L'état de phosphorylation de SRC-3 et les combinaisons d'autres modifications modulent spécifiquement les interactions du coactivateur avec d'autres corégulateurs comme CBP, p300 et CARM1 (Figure 22a) (Giamas *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2008; Torchia *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2004b; Wu *et al.*, 2005). De manière intéressante, en interagissant avec SRC-3 phosphorylé, Pin1 induit des changements conformationnels qui augmentent l'interaction du coactivateur avec CBP/p300 (Figure 22d) (Yi *et al.*, 2005). L'état de phosphorylation de SRC-3 influence également son interaction avec les RN (Wu *et al.*, 2004b, pour revue Li and Shang, 2007) et celle des RN avec leurs éléments de réponse (Amazit *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2004b). Ces effets peuvent être réversés par des **phosphatases** comme PDXP (Tableau 4) (Pancreas/Duodenum homeobox protein 1), PP1 (Protein

Phosphatase 1) et PP2A dont la surexpression réduit considérablement l'interaction entre ER et SRC-3 (Li et al., 2008).

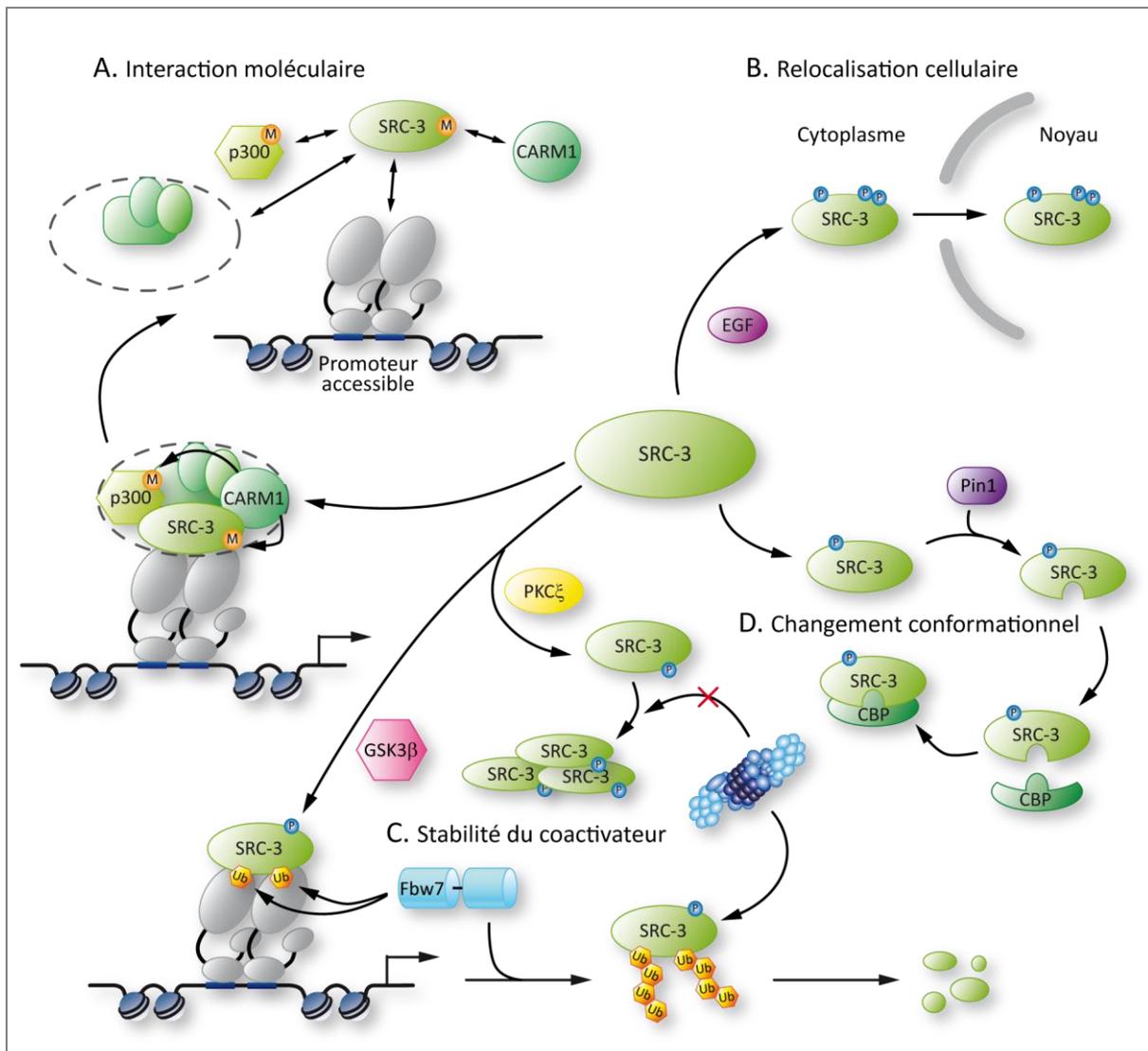


Figure 22 : Propriétés de SRC-3 régulées par des PTM

- A. **Modulation des interactions moléculaires.** SRC-3 est recruté sur le promoteur avec d'autres coactivateurs. Une fois la transcription initiée, il est méthylé et se dissocie.
- B. **Régulation de la localisation de SRC-3.** EGF induit la phosphorylation de SRC-3 et son import dans le noyau.
- C. La phosphorylation régule la **stabilité de SRC-3** soit en empêchant soit en favorisant le recrutement du protéasome
- D. **Régulation des changements conformationnels.** Pin1 interagit avec SRC-3 phosphorylé et induit des changements conformationnels qui augmentent l'interaction entre le coactivateur et CBP.

Dans les cellules, le niveau d'expression de SRC-3 est finement régulé, en particulier *via* sa dégradation, elle-même modulée par différentes combinaisons de phosphorylations et/ou de PTM qui participent à son ubiquitination (Figure 22c). En effet, en réponse aux œstrogènes, la kinase **GSK3** (Glycogen Synthase Kinase 3) phosphoryle la sérine 509 de SRC-3, ce qui induit la phosphorylation de la sérine adjacente 505 (Figure 23). Cette dernière phosphorylation permet le recrutement de la **E3 ubiquitine ligase Fbw7** (F-box and WD-40 domain-containing protein 7 α) qui monoubiquitine SRC-3 au niveau des lysines 723 et 786 (Wu et al., 2007). Ces monoubiquitinations participent de façon positive à l'activation des gènes cibles de ER ; ainsi, à chaque cycle transcriptionnel, une ubiquitine est greffée à la précédente. Lorsque la chaîne d'ubiquitines compte plus de 4 unités, le protéasome est recruté et dégrade le coactivateur (Wu et al., 2007).

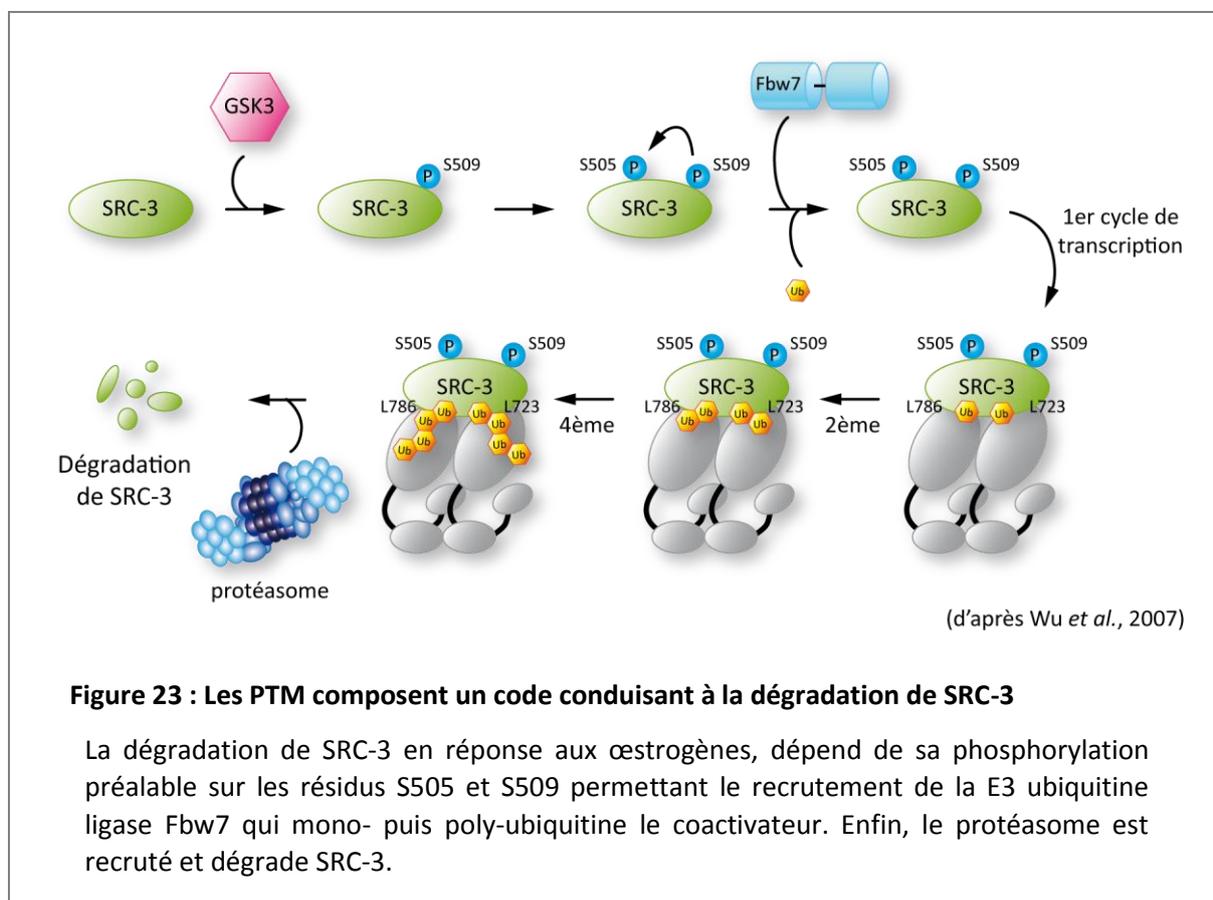


Figure 23 : Les PTM composent un code conduisant à la dégradation de SRC-3

La dégradation de SRC-3 en réponse aux œstrogènes, dépend de sa phosphorylation préalable sur les résidus S505 et S509 permettant le recrutement de la E3 ubiquitine ligase Fbw7 qui mono- puis poly-ubiquitine le coactivateur. Enfin, le protéasome est recruté et dégrade SRC-3.

Cependant, le recrutement du protéasome peut être inhibé par d'autres phosphorylations. Ainsi, la phosphorylation de SRC-3 par les kinases **aPKC** (atypical Protein Kinase C) (Figure 22c) et **CKδ** (Casein Kinase δ) interrompt l'interaction avec des sous-unités du protéasome et stabilise le coactivateur (Yi et al., 2008). Il est intéressant de noter que la aPKC est surexprimée dans de nombreux cancers et participerait ainsi *via* la stabilisation de SRC-3 à leur progression *via* la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire (Yi et al., 2008).

b. Rôles de la phosphorylation de SRC-3 en réponse à l'AR

En réponse à l'AR, SRC-3 devient rapidement phosphorylé par la p38MAPK (Gianni et al., 2006). Dans un premier temps, cette phosphorylation participe à l'initiation de la transcription des gènes cibles (Gianni et al., 2006). Etant donné que la phosphorylation de SRC-3 supprimerait l'interaction avec RAR α , il a été proposé que cette phosphorylation participerait à la dynamique des échanges entre les RAR et leurs corégulateurs (Chai et al., 2009; Gianni et al., 2006). Des résultats similaires ont été obtenus dans des cellules lymphocytaires (NB4) (Gianni et al., 2006) et dans des cellules embryonnaires neuronales (Chai et al., 2009).

Enfin, de façon surprenante, à la fin de la réponse à l'AR, la phosphorylation de SRC-3 induit sa dégradation par le protéasome (Gianni et al., 2006). Il est important de noter que ce type de régulation de SRC-3 n'a été observé qu'en présence de RAR α . En effet, **aucune phosphorylation et/ou dégradation du coactivateur n'a été observée en présence de RAR γ** (Gianni et al., 2006). Les raisons de cette divergence n'ont pas encore été élucidées.

En conclusion, le code formé par la combinaison de phosphorylations et d'autres PTM permet **l'intégration de multiples signaux** afin de composer une réponse adaptée et précise. Cela explique, en partie, comment dans des contextes différents une seule protéine peut être impliquée dans de nombreux mécanismes moléculaires et induire des réponses fines et spécifiques (Li and Shang, 2007; Lonard and O'Malley B, 2007).

C. Phosphorylation et cancer

1. Phosphorylation aberrante des RAR et cancer

En réponse à des facteurs environnementaux (irradiation aux UV et choc thermique), lors d'inflammations ou dans certains cas de cancers, de nombreuses voies kinasiques sont activées et notamment la voie des JNK. Parmi les protéines cibles de ces voies, on trouve des facteurs de transcription mais également les récepteurs nucléaires (Tableau 2 p62) (Rochette-Egly, 2003; Zhu et al., 1997). De manière générale, bien que les sites de phosphorylation varient selon les cancers et les agents de stress étudiés, ces modifications aboutissent à la répression de l'expression des gènes cibles de l'AR.

In vivo, en réponse aux UV, les **JNK** sont activées et phosphorylent RAR α au niveau de trois résidus : la thréonine 181 dans le LBD et les sérines 445 et 461 dans la région F (Srinivas et al., 2005). Ces phosphorylations conduisent à une ubiquitination du récepteur et à sa dégradation rapide par le protéasome *via* un mécanisme encore non élucidé (Srinivas et al., 2005).

Dans certains types de cancers, dont les cancers du sein, les **RTK** sont dérégulés, mutés, amplifiés ou hyper-activés (Blume-Jensen and Hunter, 2001). Par voie de conséquence, les voies de phosphorylation situées en aval (MAPK, Akt, etc...) sont suractivées et phosphorylent de façon aberrante de nombreux substrats dont les RAR. En effet, il a été montré que dans ce cas, Akt peut phosphoryler RAR α au niveau de la sérine 96 du DBD, bien que ce résidu n'appartienne pas à un site consensus pour cette kinase (Tableau 2 p62) (Srinivas et al., 2006). Cette phosphorylation affecte la fixation de l'hétérodimère à l'ADN et donc la transactivation des gènes cibles de l'AR. En parallèle, Akt phosphoryle SMRT entraînant une stabilisation de son interaction avec RAR α et une compaction accrue de la chromatine. Ces deux effets convergent en réprimant les gènes cibles de l'AR, tel que RAR β 2 (Lefebvre et al., 2006) et expliquent en partie la résistance de ces cancers à l'AR (Neri et al., 2003). Ainsi, l'utilisation thérapeutique d'anticorps spécifiques (Herceptin ou Trastuzumab) dirigés contre les RTK restaure la capacité de RAR/RXR à se lier à l'ADN et à induire la transcription des gènes cibles (Siwak et al., 2003) ainsi que l'effet antiprolifératif de l'AR (Tari et al., 2002).

De la même façon, la dérégulation ou l'hyperactivation de la **PKC** entraîne une baisse de l'activité transcriptionnelle des RAR (Delmotte et al., 1999). En effet, en phosphorylant le DBD de RAR α au niveau de la sérine 157 (Tableau 2 p62), la PKC induit une diminution de la capacité d'hétérodimérisation de RAR α avec RXR et de leur affinité pour les RARE (Delmotte et al., 1999). *In vivo*, la PKC phosphoryle également la sérine 115 de RAR α et la thréonine 162 de RXR α (Sun et al., 2007). La phosphorylation de ces résidus induit la dissociation des récepteurs de l'ADN (Sun et al., 2007).

Enfin, dans les cellules leucémiques, la kinase **CAMKII γ** (Ca²⁺ CalModuline Kinase II γ) se lierait au LBD de RAR α *via* un motif LxxLL et phosphorylerait une ou plusieurs thréonines de la région charnière (Si et al., 2007). Ces phosphorylations maintiendraient le récepteur dans une configuration inactive (Si et al., 2007). En réponse au ligand, la kinase se dissocierait levant ainsi la répression des gènes cibles (Si et al., 2007).

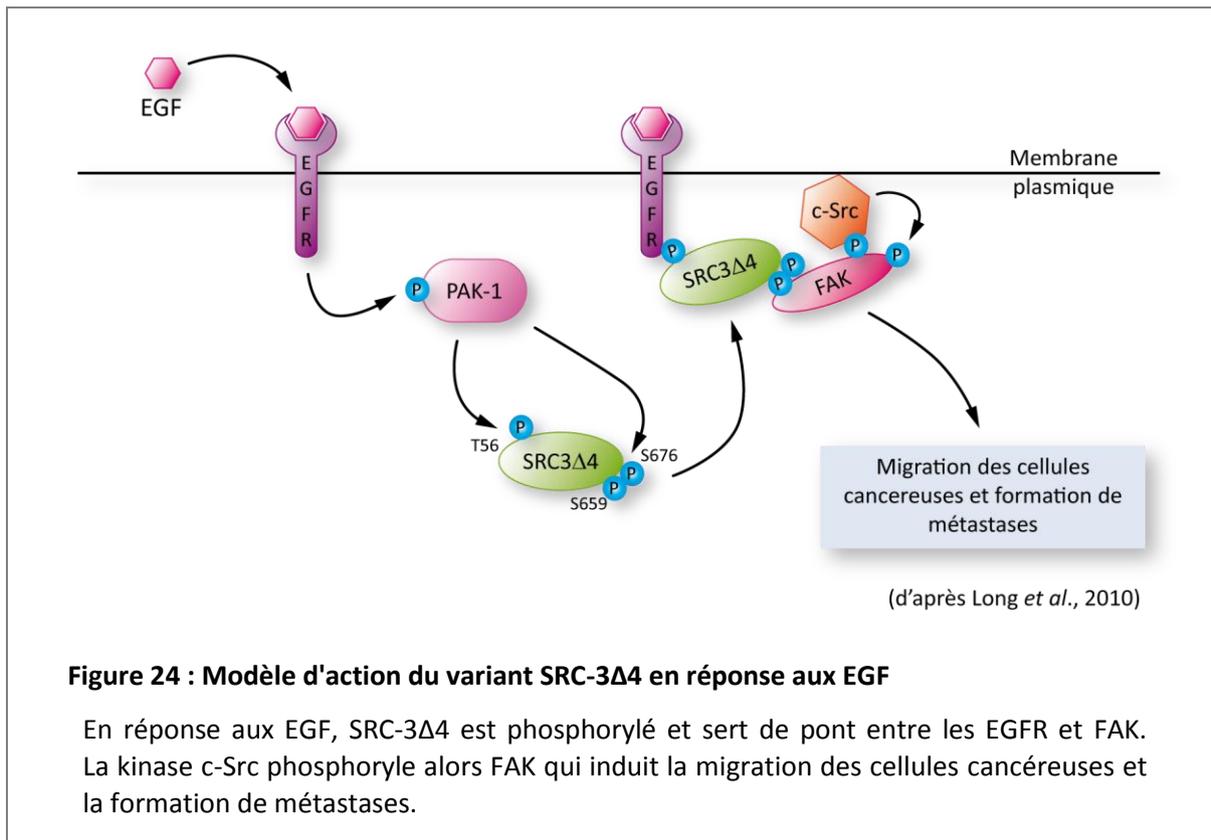
Ainsi des hypo-et/ou hyperactivations de voies kinasiques, fréquemment observées dans divers cancers, conduisent à des dérégulations du fonctionnement des RAR et seraient à l'origine des mécanismes de résistance aux effets antiprolifératifs de l'AR.

2. Phosphorylation de SRC-3 et cancer

SRC-3 a été initialement identifié comme un **oncogène** de par sa surexpression ou par son amplification dans les cancers du sein (Anzick et al., 1997; Fereshteh et al., 2008, pour revue Gojis et al., 2010; Xu et al., 2009a). Son rôle oncogénique a été validé dans des modèles transgéniques

murins surexprimant SRC-3. Ces souris développent des tumeurs mammaires invasives ainsi que d'autres tumeurs/métastases au niveau des poumons, de la peau, de l'utérus, du cerveau, des os et de l'hypophyse (Torres-Arzayus et al., 2004). Le développement de ces cancers met en jeu des effets dépendants ou indépendants des récepteurs des œstrogènes (Torres-Arzayus et al., 2004) mais serait intimement lié à l'état de phosphorylation du coactivateur (Wu et al., 2005). De façon intéressante, la surexpression de SRC-3 dans les cancers du sein est souvent associée à l'expression de ErbB2 qui active les voies MAPK (ERK1/2 et JNK) et Akt induisant la phosphorylation de SRC-3 et de ER (Font de Mora and Brown, 2000; Lahusen et al., 2007; Xu et al., 2009a). Ces cascades de phosphorylation participent à l'activation et/ou à la stabilisation du coactivateur *via* l'inhibition du recrutement du protéasome (Oh et al., 2008; Yi et al., 2008) et *in fine* à la prolifération cellulaire.

De manière intéressante, le variant **SRC-3Δ4** de SRC-3, provenant d'un épissage alternatif, est surexprimé dans certaines tumeurs mammaires (Reiter et al., 2001). Il est également impliqué dans des phénomènes de tumorigénèse et présente un mécanisme d'action différent du SRC-3 sauvage. SRC-3Δ4 ne possède pas les six premiers exons comprenant les domaines bHLH/PAS et n'a donc pas de signal NLS, de ce fait sa localisation est cytoplasmique (Li et al., 2007a; Reiter et al., 2001). En réponse à des EGF, la kinase PAK-1 (p21-Activated kinase-1) est activée et phosphoryle le coactivateur SRC-3Δ4 sur trois résidus sérine/thréonine (Figure 24) (Long et al., 2010; Reiter et al., 2001). Ces phosphorylations entraînent la translocation de SRC-3Δ4 vers la membrane plasmique et son interaction avec EGFR et FAK (Focal Adhesion Kinase). En fait SRC-3Δ4 servirait de pont entre ces deux protéines. Le coactivateur participe ainsi à la transduction du signal EGF, induisant la migration cellulaire et le processus de tumorigénèse (Long and O'Malley, 2010).



IV. Les RAR et leur coactivateur SRC-3 sont dégradés par le système ubiquitine-protéasome

A la fin du signal rétinoïde, après avoir été impliqués dans des cycles transcriptionnels, les RAR, RXR et SRC-3 sont dégradés (Bastien and Rochette-Egly, 2004; Boudjelal et al., 2000; Bour et al., 2007; Gianni et al., 2002a; Gianni et al., 2003; Kopf et al., 2000; Osburn et al., 2001; Zhu et al., 1999a). Cette dégradation fait intervenir le système ubiquitine-protéasome (UPS : Ubiquitin Proteasome System) (Boudjelal et al., 2002; Boudjelal et al., 2000; Bour et al., 2007; Kopf et al., 2000). De manière générale, l'ubiquitination des RAR a lieu en réponse à l'AR. Cependant, dans certains cas, une ubiquitination basale ligand-indépendante des RAR a été observée (Nagai et al., 2004; Tanaka et al., 2001; Wu et al., 2004a; Zhu et al., 1999a).

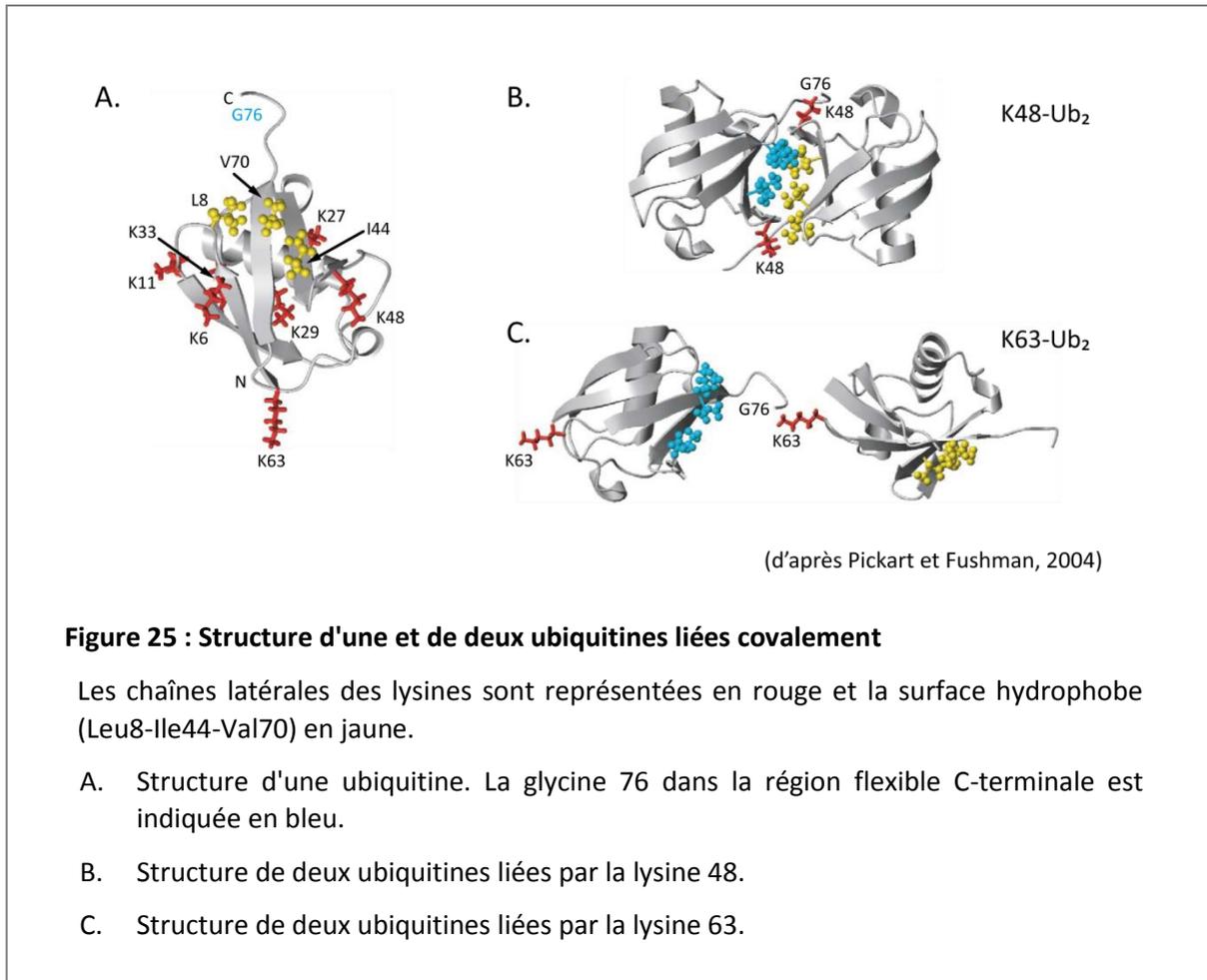
A. Le système ubiquitine-protéasome

1. L'ubiquitination

a. L'ubiquitine

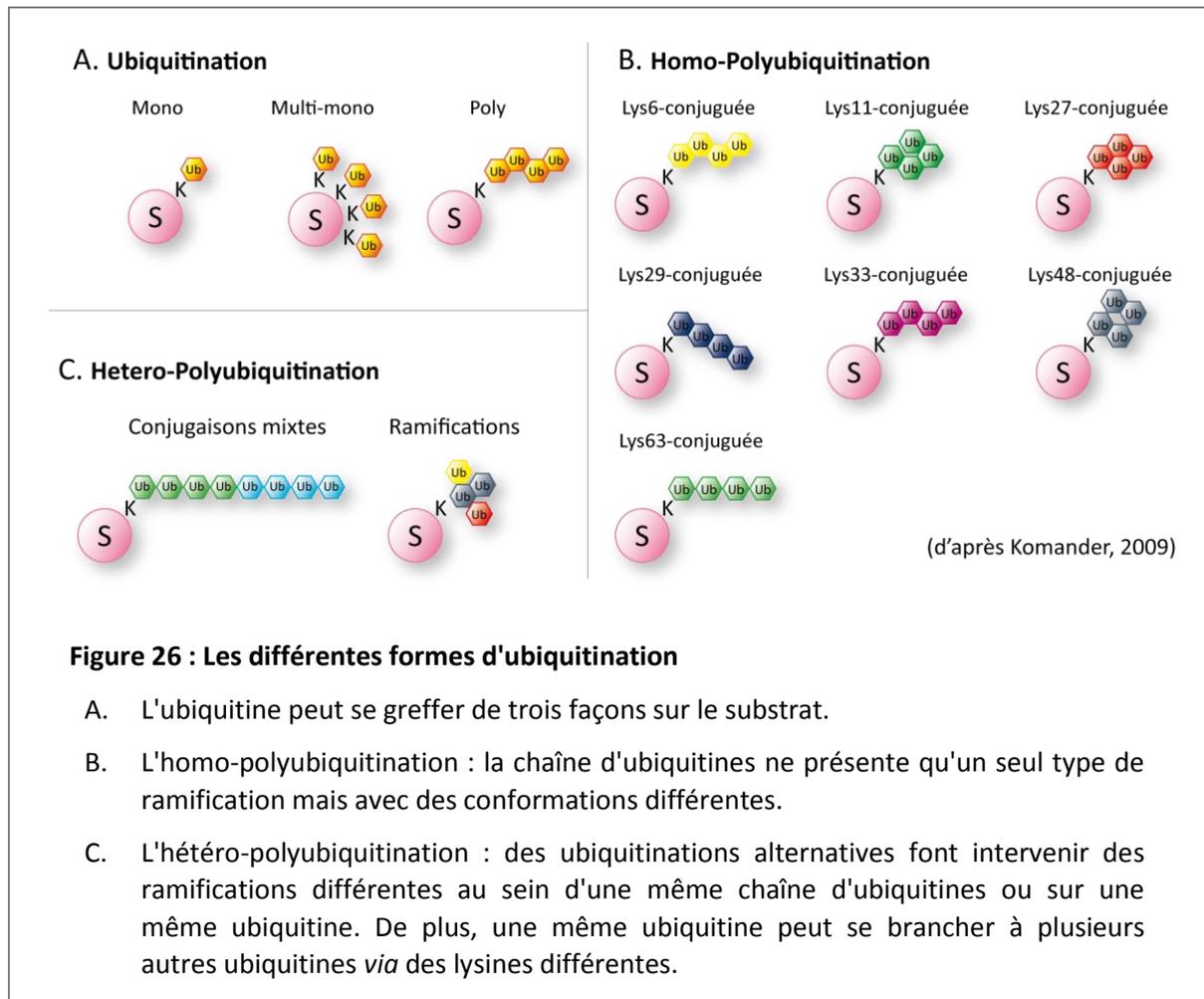
L'**ubiquitine (Ub)** est une petite protéine de 76 acides aminés présentant une structure globulaire (Figure 25a) et exprimée de façon ubiquitaire chez tous les eucaryotes. Caractérisée par la présence d'un domaine "ubiquitin fold", elle appartient à la même famille de protéines que Nedd8 ou SUMO (Small Ubiquitin related Modifier) (Pickart and Eddins, 2004). La séquence de l'ubiquitine est **très conservée** puisque seuls trois acides aminés diffèrent entre l'Homme et la levure, ce qui indique une forte pression de sélection (Pickart and Eddins, 2004). Elle présente une surface hydrophobe constituée par les résidus Leu8-Ile44-Val40 (Figure 25a) et impliquée dans l'interaction des ubiquitines entre elles au sein d'une même chaîne ou avec des protéines possédant des domaines de liaison à l'ubiquitine ou UBD (Ubiquitin Binding Domain).

Certains résidus sont directement impliqués dans les propriétés fonctionnelles de l'ubiquitine. Ainsi, la glycine 76 C-terminale est capable de former **une liaison covalente avec une lysine** du substrat ou avec l'une ou l'autre des sept lysines : **K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63** d'une autre molécule d'ubiquitine (Figures 25 et 26). L'ubiquitine pourrait aussi se lier en "tête à queue" avec une autre ubiquitine *via* l'acide aminé N-terminal (Vosper et al., 2009).



Ainsi, plusieurs ubiquitines peuvent s'additionner les unes aux autres et former différents types de chaînes (Figures 25b, c et 26). Selon la lysine mise en jeu et le nombre d'ubiquitines greffées, les chaînes adoptent des conformations différentes (Figure 26). A titre d'exemple, les chaînes d'homo-polyubiquitination sur la Lys48 présentent une structure compacte du fait de l'établissement de liaisons non covalentes entre les surfaces hydrophobes Leu8-Ile44-Val70. Par contre, les chaînes d'homo-polyubiquitination sur la Lys63 sont plus étendues (figures 25c et 26b) (Varadan et al., 2004). Ces différentes conformations permettent des interactions spécifiques avec des protéines à domaines UBD et aiguillent le substrat vers des devenir et des fonctions diverses abordées dans le paragraphe IV.A.1.c.

A noter qu'au sein d'une même protéine, différentes longueurs de chaînes d'ubiquitines et différents types de ramifications peuvent exister et coopérer. Les deux ramifications majoritaires font intervenir les Lys48 et 63. C'est pourquoi, nous ne développerons que ces deux types de ramifications dans la suite du chapitre.



b. Réaction d'ubiquitination : une cascade multi-enzymatique

La réaction d'ubiquitination consiste en la fixation d'une ou de plusieurs ubiquitines sur un substrat et nécessite l'action ordonnée de trois enzymes (Figure 27) : (i) une enzyme E1 d'activation de l'ubiquitine qui la transfère ensuite à (ii) une enzyme de conjugaison E2 qui (iii) interagit avec une E3 ubiquitine ligase impliquée dans la reconnaissance du substrat et transfère l'ubiquitine sur ce dernier (Hershko and Ciechanover, 1998; Pickart, 2001; Ravid and Hochstrasser, 2008). Ces étapes conduisent aussi bien à la monoubiquitination qu'à la polyubiquitination des substrats. Il est intéressant de noter que le génome humain code **deux enzymes E1, une quarantaine d'enzymes de conjugaison E2 et plus de 600 E3 ligases.**

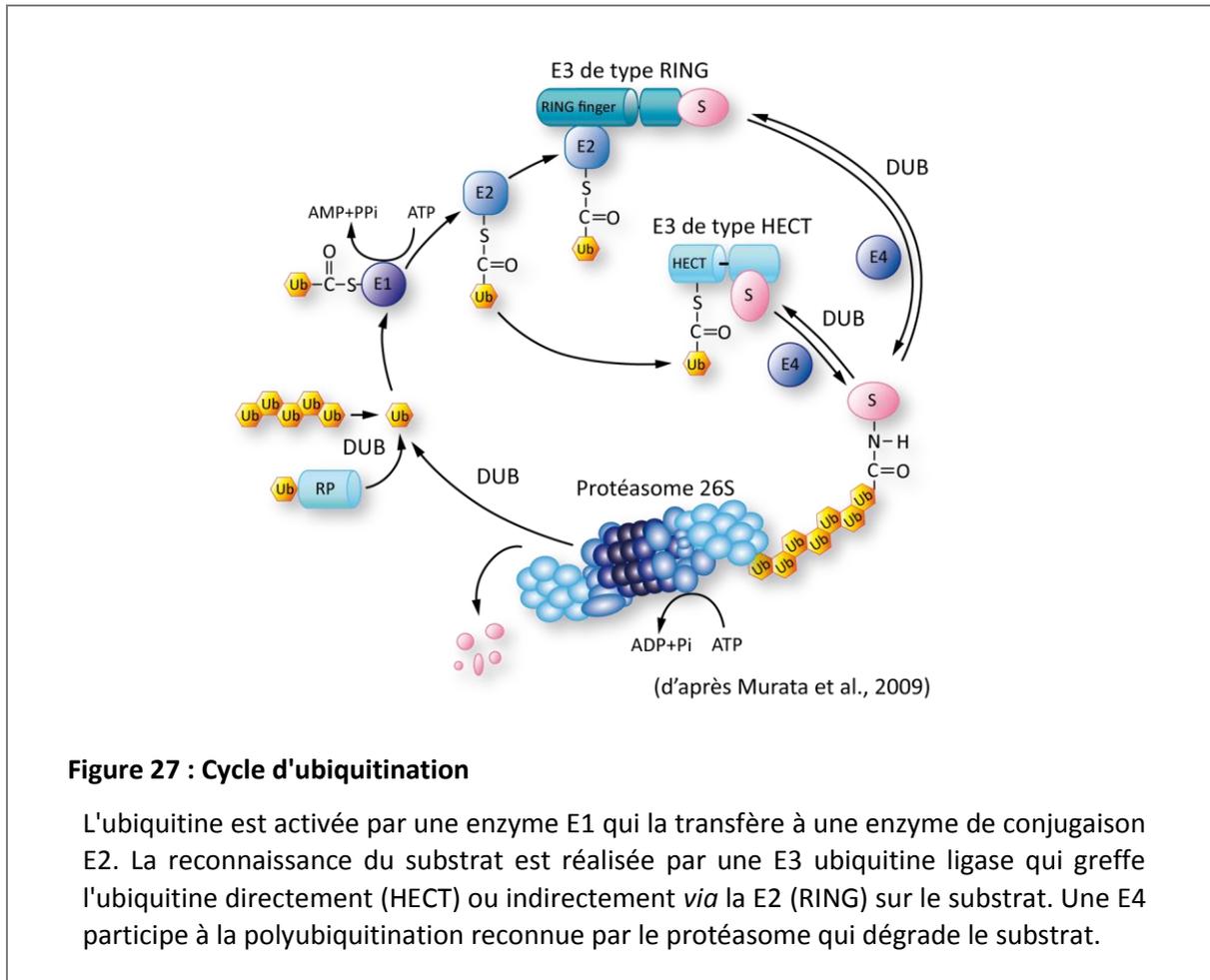


Figure 27 : Cycle d'ubiquitination

L'ubiquitine est activée par une enzyme E1 qui la transfère à une enzyme de conjugaison E2. La reconnaissance du substrat est réalisée par une E3 ubiquitine ligase qui greffe l'ubiquitine directement (HECT) ou indirectement *via* la E2 (RING) sur le substrat. Une E4 participe à la polyubiquitination reconnue par le protéasome qui dégrade le substrat.

i. E1 : enzyme d'activation de l'ubiquitine

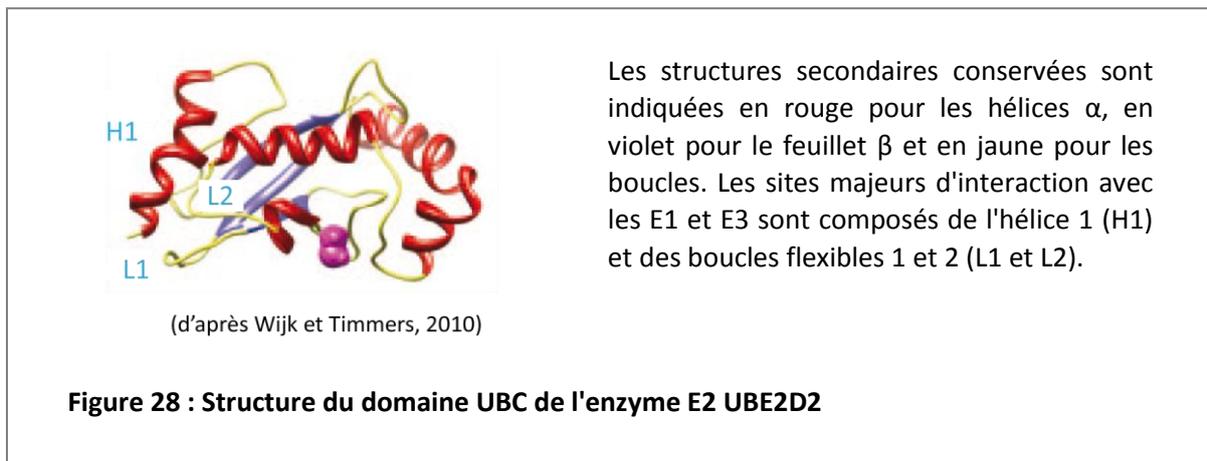
Le point de départ de la cascade d'ubiquitination est la liaison entre **l'ubiquitine**, l'ATP-Mg²⁺ et **l'enzyme d'activation E1** (Figure 27) qui catalyse l'acétyl-adénylation C-terminale de l'ubiquitine. Cette étape est suivie par la formation d'une liaison thioester de haute énergie avec l'ubiquitine activée (Haas and Rose, 1982; Haas et al., 1982).

Chez l'Homme, il n'existe que **deux E1** (Uba1 et Uba6 : Ubiquitin activating enzyme E1). Cependant, leur grande efficacité leur permet d'activer suffisamment d'ubiquitines pour les multiples réactions de conjugaison en aval (Hershko et al., 1983).

ii. E2 : enzyme de conjugaison

Ensuite, l'ubiquitine activée est transférée à une **enzyme de conjugaison E2**. Les E2, plus nombreuses que les E1, jouent un rôle central dans la cascade de réactions d'ubiquitination (Figure 27) en transférant l'ubiquitine au substrat *via* une E3 ubiquitine ligase. Cependant, le mécanisme de ce transfert diffère selon le type de E3 impliqué. La E2 peut soit transférer l'ubiquitine à une HECT-E3 (Homologous to E6-AP COOH Terminal) qui joue le rôle d'intermédiaire, soit greffer directement

l'ubiquitine au substrat en interagissant avec une RING-E3 (Really Interesting New Gene) qui sert de lien entre la E2 et le substrat (Figure 27). Les E2 forment un groupe d'enzymes conservées caractérisé par la présence d'un domaine **UBC** (Ubiquitin-Conjugating Catalytic) (Figure 28) composé de 150 à 200 acides aminés (Burroughs et al., 2008). Ce domaine renferme une cystéine catalytique impliquée dans la liaison thioester avec l'Ub et dans son transfert au substrat. Le domaine UBC sert également de **plateforme pour le recrutement des E1 et des E3** *via* les boucles flexibles L1 et L2 (Figure 28) qui présentent une forte variabilité de séquence, de longueur et de conformation permettant la sélection et l'interaction spécifique avec de nombreuses enzymes d'ubiquitination (Burroughs et al., 2008).



Des données cristallographiques montrent que les régions impliquées dans les interactions avec les E1 et E3 se superposent partiellement, ce qui implique que la E2 doit se dissocier de la E3 pour pouvoir fixer de nouveau une E1 et ainsi recommencer un cycle d'ubiquitination. A noter que les E2 peuvent de façon générale interagir avec de nombreux types de E3, mais la réciproque ne s'applique pas (Pickart and Eddins, 2004). Enfin, certaines E2 se limitent au domaine UBC (classe I) alors que d'autres arborent des extensions N- et/ou C-terminales (respectivement classes II, III ou IV) impliquées dans leur localisation cellulaire, dans la stabilisation de l'interaction avec la E1 ou dans la régulation de l'activité de la E3 associée (Winn et al., 2004). Il est intéressant de remarquer que les E2 déterminent quelle lysine du substrat sera ubiquitinée. Elles déterminent également s'il s'agira d'une mono- ou d'une polyubiquitination car cela ne fait pas intervenir les mêmes E2 (van Wijk and Timmers, 2010, Windheim et al., 2008). Ces trois derniers points suggèrent l'existence d'un niveau de régulation supplémentaire dans l'ubiquitination des substrats dirigée par les E2.

iii. E3 : Enzyme de reconnaissance

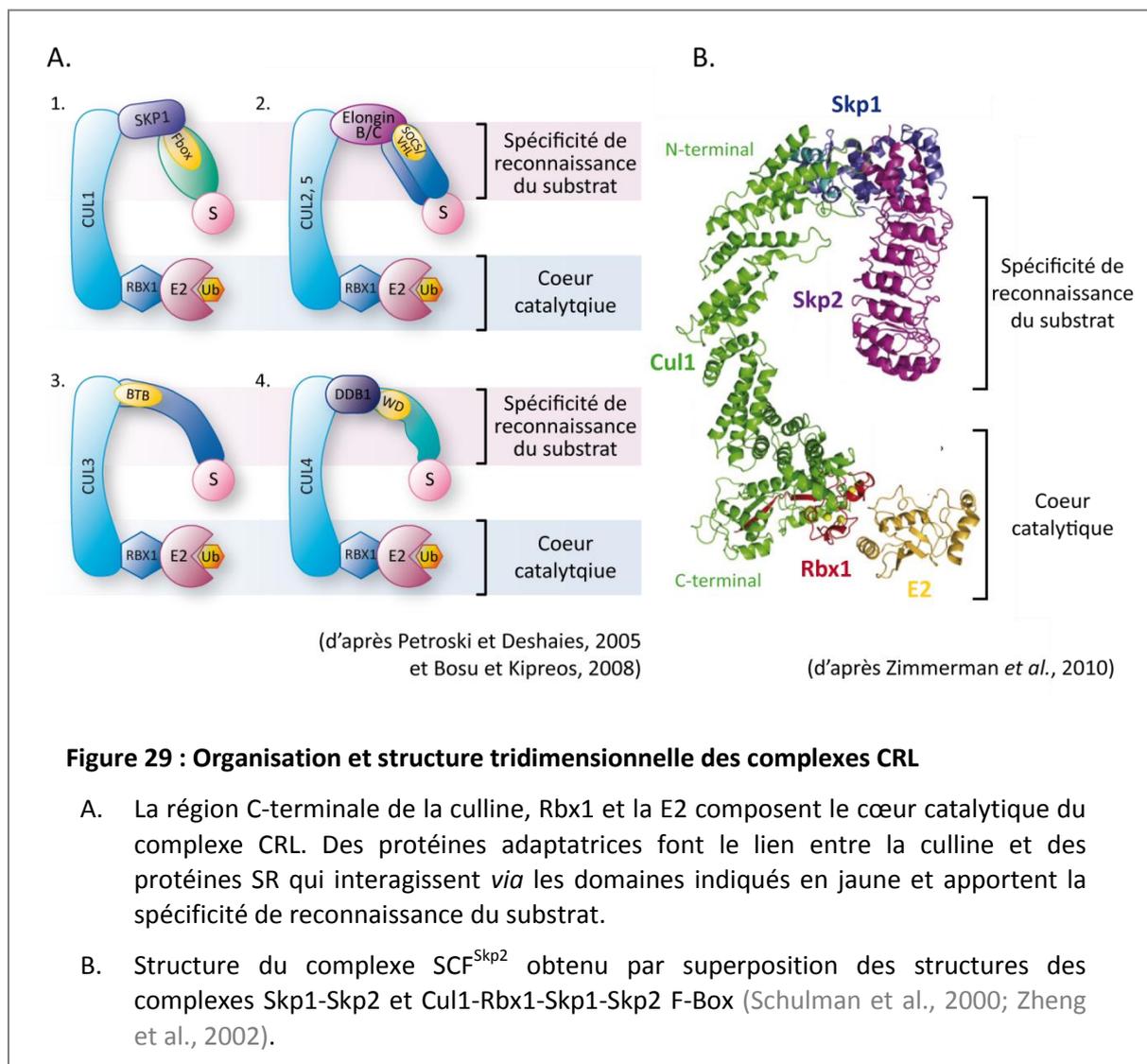
Les **E3 ubiquitine ligases** interviennent dans la **reconnaissance des substrats** et présentent donc une grande diversité à l'image de celle des protéines ubiquitinées. Il existe plusieurs types de

E3, les deux principales sont les **RING-** et les **HECT-E3 ubiquitine ligases** qui présentent des structures et des modes de fonctionnement différents bien qu'elles soient toutes capables d'interagir avec les E2 (Figure 27).

- **Les RING-E3 ubiquitine ligases**

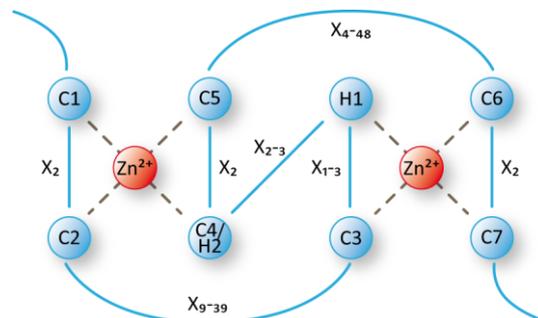
Les RING-E3 **ne possèdent pas d'activité ubiquitine ligase** (Tyers and Jorgensen, 2000) mais jouent un **rôle d'adaptateur** en mettant à proximité l'un de l'autre le substrat et la E2 qui porte l'ubiquitine activée (Joazeiro and Weissman, 2000; VanDemark and Hill, 2002).

Au sein des RING-E3 ligases, on distingue la sous-famille **CRL** (**C**ullin **R**ING **L**igase) qui arbore une architecture commune déterminée par cristallographie et basée sur la présence d'une **culline** (Cul) qui sert d'échafaudage au complexe (Figure 29). Ces complexes CRL sont des structures rigides et l'introduction de mutations modifiant l'orientation des SR ou de régions flexibles dans les cullines abolit l'activité ubiquitine ligase (Orlicky et al., 2003; Zheng et al., 2002).



Chez l'Homme, il existe **six cullines canoniques** : **Cul1, Cul2, Cul3, Cul4A, Cul4B et Cul5** (Figure 29a) qui sont respectivement à la base des complexes CRL1, CRL2, CRL3, CRL4A, CRL4B et CRL5 (Tableau 5 p82) et **trois cullines atypiques** : **APC** (Anaphase Promoting Complex), **PARC** (p53 Cytoplasmique Anchor protein) et **Cul7** qui présentent des homologies au niveau du domaine culline mais dont le reste de la protéine diffère. La culline interagit par son extrémité C-terminale avec des protéines renfermant un domaine RING, **Rbx1** (RING-box protein 1) ou plus rarement **Rbx2**, qui recrutent la E2 et forment le domaine catalytique de la E3 (Figure 29) (pour revue Zimmerman et al. , 2010). L'extrémité N-terminale de la culline fixe des **protéines SR** (Substrate Receptor) *via* des **protéines adaptatrices** (Skp1 (S-phase kinase-associated protein 1), elongin B/C, protéines à domaine WD) qui participent à la reconnaissance ainsi qu'au bon positionnement du substrat par rapport à E2.

Le domaine RING finger initialement identifié dans une protéine codée par le gène *ring1* (Really Interesting New Gene) (Lovering et al., 1993), compte entre 40 et 60 acides aminés qui définissent le motif **C-X₂-C-X₍₉₋₃₉₎-C-X₍₁₋₃₎-H-X₍₂₋₃₎-C/H-X₂-C-X₍₄₋₄₈₎-C-X₂-C** où les huit cystéines (C) et histidines (H) coordinent deux atomes de zinc (Figure 30) (Deshaies and Joazeiro, 2009). L'espacement entre ces huit résidus est conservé, bien que la séquence primaire ne le soit pas, et permet au domaine d'adopter une conformation de type "cross-braced". Le cinquième résidu conservé peut être une cystéine ou une histidine et définit respectivement deux classes : les **RING-HC** et les **RING-H2**.



(d'après Deshaies et Joazeiro, 2009)

Figure 30 : Séquence et organisation d'un domaine RING

Les deux atomes de zinc sont coordonnés par huit résidus conservés. La présence d'une cystéine à la cinquième position conservée définit la classe des RING-HC et alors qu'une histidine définit la classe des RING-H2.

Le domaine RING est directement impliqué dans l'interaction avec les E2 *via* des liaisons hydrogène et des liaisons de Van de Waals (Joazeiro and Weissman, 2000; Joazeiro et al., 1999; Pickart and Eddins, 2004).

Selon le type de culline, la reconnaissance du substrat met en jeu des complexes différents (Tableau 5) (pour revue : Bosu and Kipreos, 2008). Ainsi dans le cas de CRL1, **Cul1** fait partie du **complexe SCF** (Skp1-Cullin-F-Box) comprenant la protéine "adaptateur" **Skp1** et une protéine **SR** qui interagit avec Skp1 *via* un domaine **F-box** et d'autre part avec le substrat *via* des domaines WD40 ou LRR (Leuцин Rich Repet) (Figure 29a.1 et Tableau 5) (Schulman et al., 2000; Zheng et al., 2002). Les protéines à domaine F-box interagissent généralement avec des résidus phosphorylés des substrats, ce qui implique que leur ubiquitination et leur dégradation sont phosphodépendantes (Petroski and Deshaies, 2005). Chez l'Homme, il existe 38 protéines SR à domaines F-box et donc, au moins autant de SCF-E3. Ces complexes interviennent majoritairement dans le contrôle du cycle cellulaire.

Complexe	Culline	RING	Adaptateur	Récepteur de substrat
CRL1	CUL1	Rbx1	Skp1	F-Box
CRL2	CUL2	RING	elongin BC	SOCS/BC-box protéine
CRL3	CUL3	Rbx1		BTB
CRL4A	CUL4A	RING	DDB1	Recepteur
CRL4B	CUL4B	RING		?
CRL5	CUL5	Rbx2	elongin BC	SOCS/BC-box protéine
CRL7	CUL7	RING	Skp1	SFBX29

(d'après Petroski et Deshaies, 2005)

Tableau 5 : Composition des complexes Culline-RING-Ligase (CRL)

Les complexes **CRL2** et **CRL5** présentent des organisations et des structures similaires bien que leurs compositions diffèrent (Figure 29a.2) (Bullock et al., 2006; Kamura et al., 2004; Mahrour et al., 2008; Stebbins et al., 1999). La protéine "adaptateur" est l'Elongin B/C, un homologue structural de Skp1, qui interagit avec des classes de protéines SR différentes selon le CRL considéré. Ainsi, l'Elongin C interagit avec des protéines SR à motifs VHL-box (Von Hippel Lindau box) dans les complexes CRL2 et avec des SR à domaines SOCS (Suppressor Of Cytokine Signalling) dans les complexes CRL5 (Kamura et al., 2004).

Quant aux **CRL4**, ils arborent des architectures plus complexes ; la protéine adaptateur DDB1 (DNA Damage-Binding protein 1) interagit avec des protéines SR à domaines WD40 (Figure 29a.3) (Angers et al., 2006) ou directement avec le substrat (Hu et al., 2004).

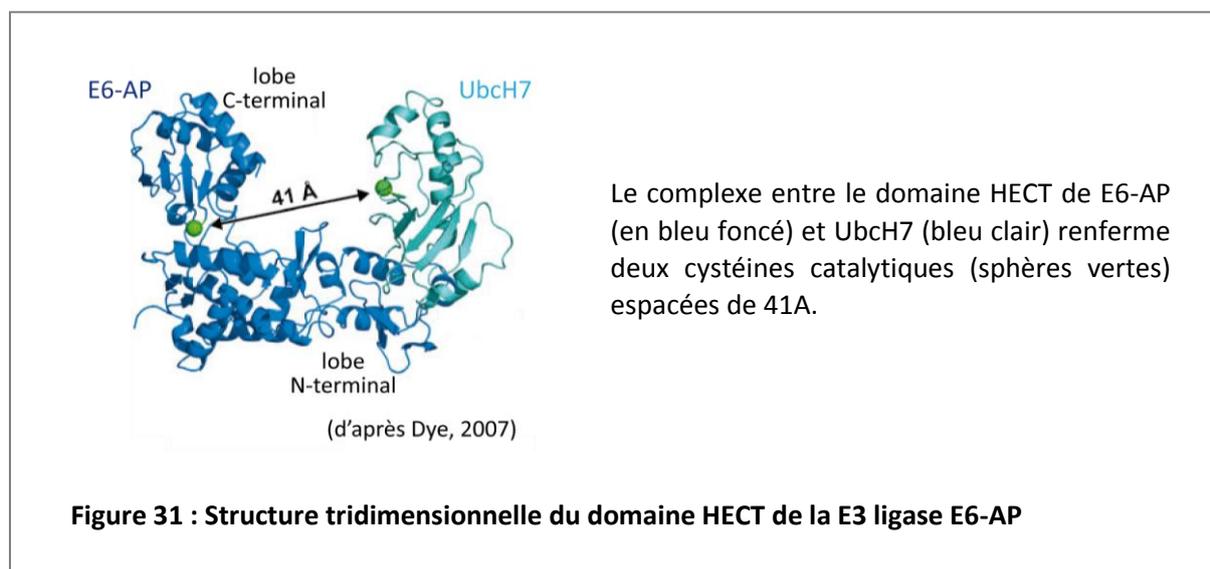
Enfin, au sein des **CRL3**, les fonctions d'"adaptateur" et de reconnaissance du substrat sont portées par **une même protéine appartenant à la famille des protéines BTB** (Broad complex, Tramtrack, Bric-a-brac) (Figure 29a.4) (Pintard et al., 2004; Pintard et al., 2003; Xu et al., 2003). Le

domaine BTB intervient dans l'interaction avec la culline alors que la reconnaissance du substrat est assurée par des domaines du type Kelch, MATH (Meprin And TRAF Homology) ou ZnF (Pintard et al., 2003; Stogios et al., 2005) (pour revue Petroski and Deshaies, 2005). Cependant, les domaines BTB peuvent aussi interagir entre eux et conduire à la dimérisation des CRL3 (Ahmad et al., 1998) nécessaire à l'ubiquitination de certains substrats (Xu et al., 2003; Zhuang et al., 2009).

En conclusion, les différentes combinaisons d'assemblage des cullines et des SR permettent d'obtenir plus de 500 CRL différents (Zimmerman et al., 2010). A cela s'ajouteraient des possibilités d'homo- et d'hétérodimérisation des F-box, des RING et des protéines BTB qui élargissent encore l'éventail de reconnaissance des substrats (Suzuki et al., 2000; Zhuang et al., 2009).

- **Les HECT-E3 ubiquitine ligases**

La deuxième classe d'E3 ubiquitine ligases comprend les enzymes à **domaine HECT** (Homologous to E6-AP COOH Terminal) (Huibregtse et al., 1995). Cette famille contient trois membres E6AP-HECT (Human papillomavirus E6-Associated Protein), KIAA10 et Rsp5 (Reverses SPT-phenotype protein 5). Le domaine HECT, composé de 350 acides aminés, est localisé en C-terminal des HECT-E3 ligases et adopte une structure bilobée (Figure 31) (Huang et al., 1999). La cystéine du petit lobe C-terminal intervient dans le transfert de l'ubiquitine et le grand lobe N-terminal est impliqué dans l'interaction avec les E2 (Rotin and Kumar, 2009).



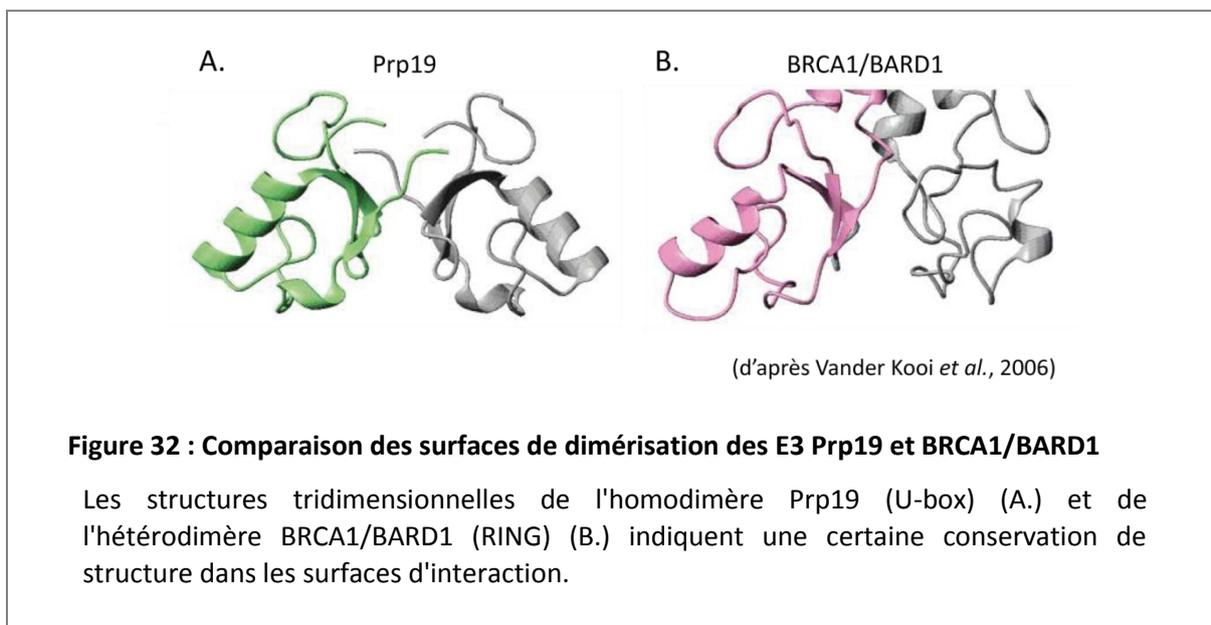
Contrairement aux RING-E3, les HECT-E3 jouent réellement un rôle catalytique puisqu'elles transfèrent l'ubiquitine activée au substrat. Il est intéressant de noter que les membres de cette famille **catalysent la formation de chaînes d'ubiquitines différentes**. En effet, Rsp5 intervient dans la monoubiquitination alors que les E6AP-HECT conduisent à des ramifications utilisant seulement la Lys48. Quant aux KIAA10, elles assemblent des ubiquitines *via* les Lys29 (Shih et al., 2003; Wang et

al., 2006). Enfin, les régions en amont du domaine HECT sont impliquées dans la reconnaissance du substrat, la localisation cellulaire et la régulation des ligases.

- **Les E3 ubiquitine ligases atypiques**

Certaines E3 ne contiennent ni domaine HECT ni domaine RING finger mais possèdent des domaines qui ressemblent structurellement au RING finger.

Ainsi, les enzymes MIR1 (Modulator of Immune Recognition 1) et MAP3K MEKK1 à activité E3 ligase renferment des domaines **PHD** (Plant HomeoDomain) qui adoptent la même conformation en « cross-braced » que le RING finger (Capili et al., 2001; Coscoy et al., 2001; Lu et al., 2002; Pascual et al., 2000). De même, les protéines **CHIP** (C terminus of Hsc70-Interacting Protein), **Prp19** et **E4B** renferment un domaine **U-box** (UFD2-homology domain) dont la structure est identique au RING finger à la différence qu'il ne coordine pas d'atomes de zinc (Figure 32) (Aravind and Koonin, 2000). Les protéines à U-box ne possèdent pas d'activité ubiquitine ligase et jouent donc, comme les protéines à domaine RING, un **rôle d'"adaptateur"** permettant le bon positionnement de E2 par rapport au substrat (Benirschke et al. , 2010; Xu et al., 2008). Parmi ces E3 à U-box, E4B est la seule à ne pas s'homodimériser et à fonctionner en tant que monomère (Benirschke et al. , 2010). CHIP et E4B renferment aussi en N-terminal d'autres motifs comme des TPR (Tetratricopeptide Repet) qui interagissent avec des chaperonnes dont elles ubiquitinent les substrats (Murata et al., 2003).



iv. E4 : facteur d'élongation

Les facteurs d'élongation E4 sont des enzymes qui agissent en collaboration avec les E1, E2 et E3 et permettent **l'allongement des chaînes d'ubiquitines** sur des substrats déjà mono- ou

polyubiquitinés (Hoppe, 2005). La première E4 étudiée est la protéine de levure UFD2 qui se lie aux substrats portant une à trois ubiquitines et catalyse l'ajout de nouvelles ubiquitines (Koegl et al., 1999). La première famille de E4 caractérisée présente en position C-terminale un domaine U-box. C'est le cas de CHIP et E4B, abordées ci-dessus, qui fonctionnent également comme des E4 vis-à-vis d'autres substrats (Imai et al., 2002). Cependant, certaines E4 ne possèdent pas de domaine U-box. C'est notamment le cas de la protéine p300 qui reconnaît *in vitro* la protéine p53 monoubiquitinée par Mdm2 et entraîne l'élongation de la chaîne d'ubiquitines en collaboration avec Mdm2 (Grossman et al., 2003).

Le mécanisme d'action des E4 reste à déterminer mais ces enzymes seraient nécessaires au choix de la lysine impliquée dans la polyubiquitination. Les E4 joueraient également un rôle dans le réarrangement des chaînes naissantes d'ubiquitines à l'image de chaperonnes et aideraient à leur reconnaissance par les E3 (Koegl et al., 1999). De plus, elles réguleraient le passage de mono- à polyubiquitine en modifiant le type de ramification de l'ubiquitine (Hoppe, 2005).

v. Les déubiquitinases (DUB)

L'ubiquitination est un processus dynamique et réversible. En effet, les ubiquitines peuvent être enlevées par des protéases spécifiques : les **déubiquitinases** ou DUB (Deubiquitylating enzyme). Les DUB regroupent cinq familles, quatre familles de protéases à cystéine et une famille de métalloprotéases codées chez l'Homme par une centaine de gènes (Nijman et al., 2005; Ventii and Wilkinson, 2008). Lors du recyclage de l'ubiquitine, à l'entrée du protéasome, les DUB hydrolysent la liaison peptidique en aval de la glycine 76 qui relie l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine au substrat mais elles peuvent également intervenir dans la maturation de l'ubiquitine (Amerik and Hochstrasser, 2004). Ainsi, les DUBs interviennent dans le maintien du "pool" d'ubiquitines libres dans la cellule.

c. Rôle double de l'ubiquitine : vers la dégradation ou non

Les substrats peuvent être soit mono-, soit polyubiquitinés et plusieurs types de chaînes d'ubiquitines existent au sein des cellules. Les enchaînements homogènes sur la Lys48 et la Lys63 sont majoritaires mais présentent des rôles opposés (Komander, 2009).

i. La monoubiquitination : rôle non protéolytique

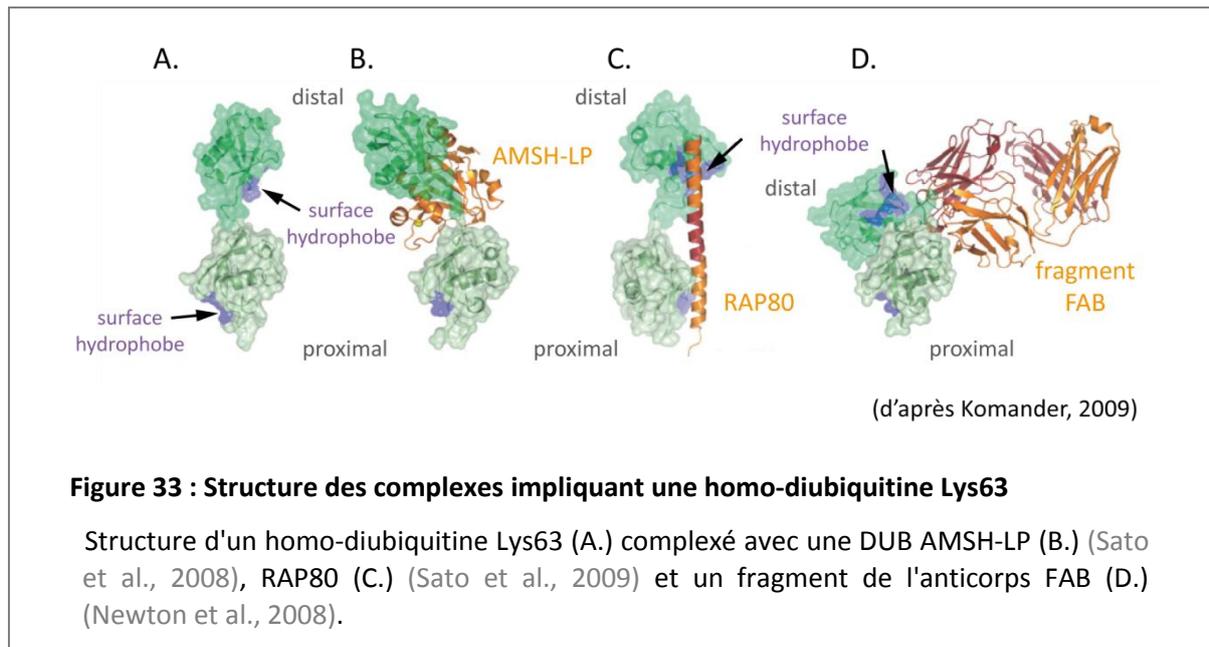
A l'image de la phosphorylation, la monoubiquitination peut induire ou inhiber des interactions protéiques et est rapidement réversible. Ces propriétés sont mises à contribution dans la régulation de divers mécanismes tels que la transcription, la réparation de l'ADN et l'endocytose de

récepteurs membranaires *via* des processus ne faisant pas intervenir le protéasome ou ses fonctions protéolytiques (pour revue : Welchman et al., 2005).

Dans le contexte de la transcription, la monoubiquitination peut avoir des rôles opposés. Ainsi, la monoubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A est associée à la répression de la transcription (Wang et al., 2004). A l'inverse, la monoubiquitination de la lysine 120 de l'histone H2B est corrélée à l'activation de gènes (Henry et al., 2003; Kao et al., 2004; Minsky et al., 2008) et est requise pour la méthylation de l'histone H3 sur les lysines 4 et 79 (Ng et al., 2002; Sun and Allis, 2002). Ces interdépendances entre les modifications post-traductionnelles des histones sont des marques épigénétiques qui composent le code histone (Jenuwein and Allis, 2001). Un autre exemple de l'implication de la monoubiquitination dans la transcription est celui de SRC-3 cité dans le paragraphe III.B.2.a où la monoubiquitination de deux résidus (K723 et K786) participe à l'activation du coactivateur en réponse aux œstrogènes (Wu et al., 2007).

ii. L'homo-polyubiquitination au niveau de la Lys63 : rôle non protéolytique

L'homo-polyubiquitination au niveau de la Lys63 représente 17% des types de ramifications (Figures 25c et 26b) (Xu et al., 2009b) et intervient dans des **processus non-protéolytiques** tels que le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la synthèse protéique, l'endocytose de récepteurs membranaires, la réponse aux stress (Chen and Sun, 2009; Varshavsky, 2005; Welchman et al., 2005) et dans la régulation de la transcription *via* notamment l'activation de coactivateurs comme nous l'avons décrit pour **SRC-3** (cf paragraphe III.B.2.a). L'analyse cristallographique de dimères d'ubiquitines liées *via* la Lys63 et associés à des interactants différents a permis de montrer que les contacts mettent en jeu des régions différentes des deux molécules d'ubiquitine expliquant ainsi la spécificité de reconnaissance de ce type de ramification (Figure 33) (Newton et al., 2008; Sato et al., 2009; Sato et al., 2008)



iii. L'homo-polyubiquitine au niveau de la Lys48 : rôle protéolytique

Par opposition aux chaînes Lys63, les chaînes **Lys48 conduisent à la dégradation des protéines**. Bien que ce type de chaîne ne représente que 29% de toutes les ramifications, il est le plus abondant dans la cellule (Xu et al., 2009b). Le motif minimal de reconnaissance est un **tétramère d'ubiquitines** liées par la Lys48 (Figures 25b p76 et 26b p77) (Thrower et al., 2000). Ce motif est reconnu par des protéines à domaines UBA (Ubiquitin-Associated) (Trempe et al., 2005; Varadan et al., 2005) qui entraînent la protéine vers la dégradation par le protéasome. Le rôle de la lys48 dans la dégradation a été mis en évidence avec l'utilisation d'un mutant d'Ub où cette lysine est mutée en arginine : aucune polymérisation de chaîne d'ubiquitines ni de dégradation du substrat n'ont été observées (Chau et al., 1989; Hershko and Ciechanover, 1998).

Cependant, ce type d'ubiquitination ne conduit pas exclusivement à la dégradation des protéines. En effet, la polyubiquitination *via* la Lys48 du facteur de transcription Met4 (Methionine-requiring protein 4) par SCF^{Met30} inhibe ses capacités d'activation de la transcription sans conduire à sa dégradation (Flick et al., 2004; Kaiser et al., 2000).

Réciproquement, le dogme selon lequel le protéasome dégrade exclusivement les substrats homo-polyubiquitinés sur la Lys48 est remis en cause. En effet, plusieurs équipes ont montré que la mono/polyubiquitination des lysines 6, 29 et 63 ou la formation de chaînes hétérogènes peuvent mener à la dégradation par le protéasome (Boutet et al., 2007; Kim et al., 2007a; Saeki et al., 2009; Shang et al., 2005; Xu et al., 2009b). Dans le cas des chaînes Lys63, leur implication minoritaire dans la dégradation s'explique par l'observation que ces chaînes d'ubiquitines interagissent avec des

protéines et sont donc moins accessibles au protéasome. De plus, elles seraient déubiquitinées six fois plus rapidement que les chaînes Lys48 empêchant la formation de chaînes composées de plus de quatre ubiquitines (Jacobson et al., 2009).

En conclusion, bien que la nature des chaînes d'ubiquitines soit un signal pour l'aiguillage des substrats vers des devenir différents, les interactions avec des protéines spécifiques (protéines SR ou chaperonnes) sont déterminantes pour l'initiation de la réponse au signal.

d. Régulation de l'ubiquitination par d'autres modifications post-traductionnelles

Les systèmes d'ubiquitination peuvent être régulés par d'autres modifications post-traductionnelles. Une des plus décrite est la neddylation qui consiste en la fixation covalente de la protéine **Nedd8** (Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down regulated 8) sur un substrat à l'image de la fixation d'ubiquitine. Nedd8 peut être conjuguée aux cullines ou aux autres sous-unités (Rbx1 et UBE2F) des complexes SCF, ce qui favorise l'interaction avec la E2 et entraîne une augmentation de l'activité catalytique du complexe (Dye and Schulman, 2007; Huang et al., 2009; Kawakami et al., 2001). Une étude récente montre que Rbx1 apporte une certaine flexibilité au complexe pour l'initiation de l'ubiquitination puis sa neddylation induit des changements conformationnels favorables à la polyubiquitination des substrats (Liu and Nussinov, 2010). De façon surprenante, ces changements conformationnels sont conservés même après déneddylation de Rbx1 (Liu and Nussinov, 2010).

Les E2 peuvent aussi s'**auto-ubiquitiner** et sont alors entraînées vers la dégradation (Li et al., 2007b; Ravid and Hochstrasser, 2007). De façon surprenante, cette auto-ubiquitination met en jeu une chaîne préassemblée de Lys48 (Ravid and Hochstrasser, 2007). D'autres modifications de type ubiquitine-like (SUMO et ISG) peuvent également avoir lieu sur des lysines des domaines d'interaction des E2 et inhibent la fixation des E1 et/ou des E3 (Pichler et al., 2005; Takeuchi and Yokosawa, 2005).

Enfin, les processus de **phosphorylation** régulent également le système d'ubiquitination (Hunter, 2007). En effet, la phosphorylation des substrats peut réguler le recrutement des E3 ligases. Par exemple, à la fin de la phase G1, la phosphorylation de Scl1 par une Cdk cycline-dépendante est le signal qui permet son interaction avec SCF^{Cdc4}, son ubiquitination et sa dégradation (Orlicky et al., 2003). Par contre, l'effet inverse est observé dans le cas de Mdm2 : sa phosphorylation inhibe la fixation de p53 et empêche donc son ubiquitination (Joazeiro and Weissman, 2000). Ainsi la

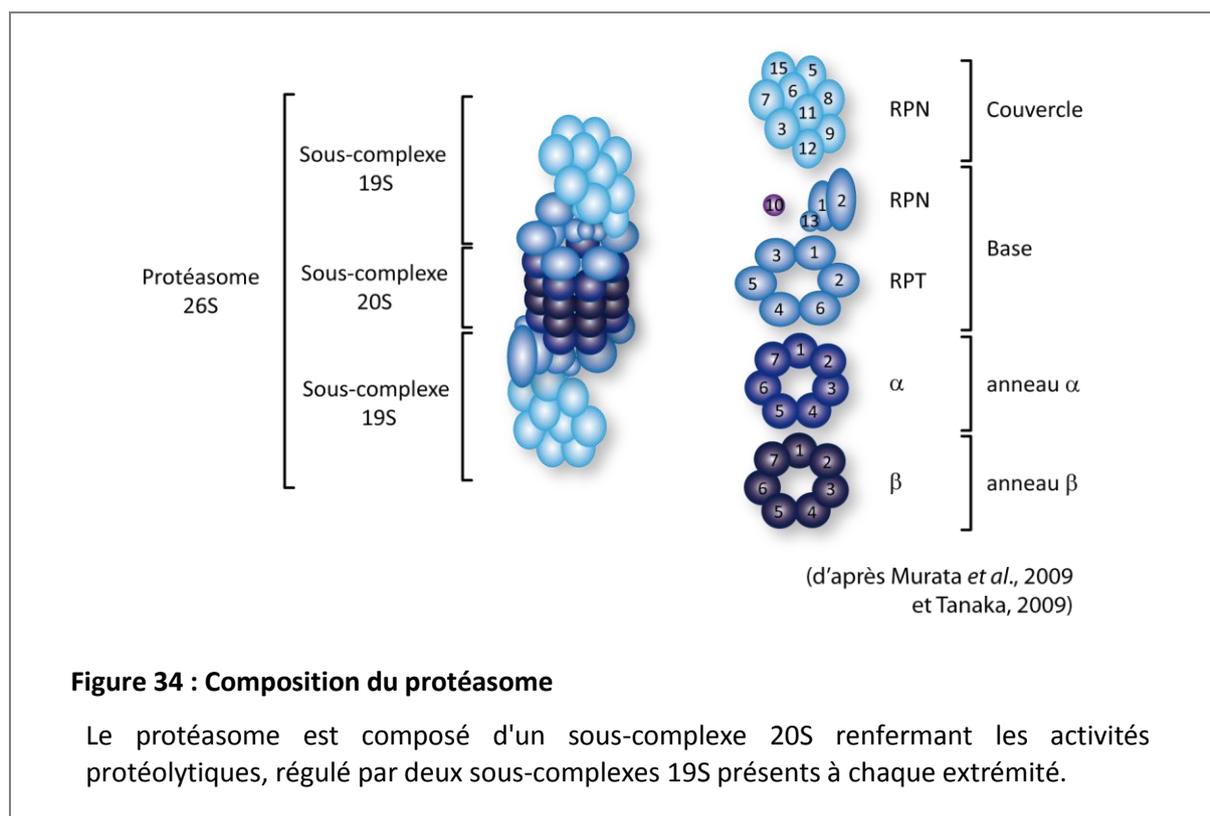
phosphorylation des substrats comme celle des enzymes de la cascade d'ubiquitination peut réguler les mécanismes d'ubiquitination (Cocchetti et al., 2008; Goebel et al., 1994; Sadowski et al., 2007).

2. Le protéasome

Le système ubiquitine-protéasome ou **UPS** (Ubiquitin Protéasome System) est avec les lysosomes, le système protéolytique majoritaire chez les eucaryotes. Il intervient non seulement dans la dégradation des protéines endommagées, anormales et mal structurées, mais aussi dans la demi-vie de protéines clés telles que les cyclines impliquées dans le cycle cellulaire.

a. Composition, structure et assemblage

Le protéasome 26S est un complexe multiprotéique de grande taille (250 kDa) composé de deux types de sous-complexes : un **sous-complexe 20S CP** (Core Particle 20S) qui porte l'activité protéolytique et deux **sous-complexes régulateurs 19S RP** (Regulatory Particle 19S) situés de part et d'autre du 20S CP (Figure 34).

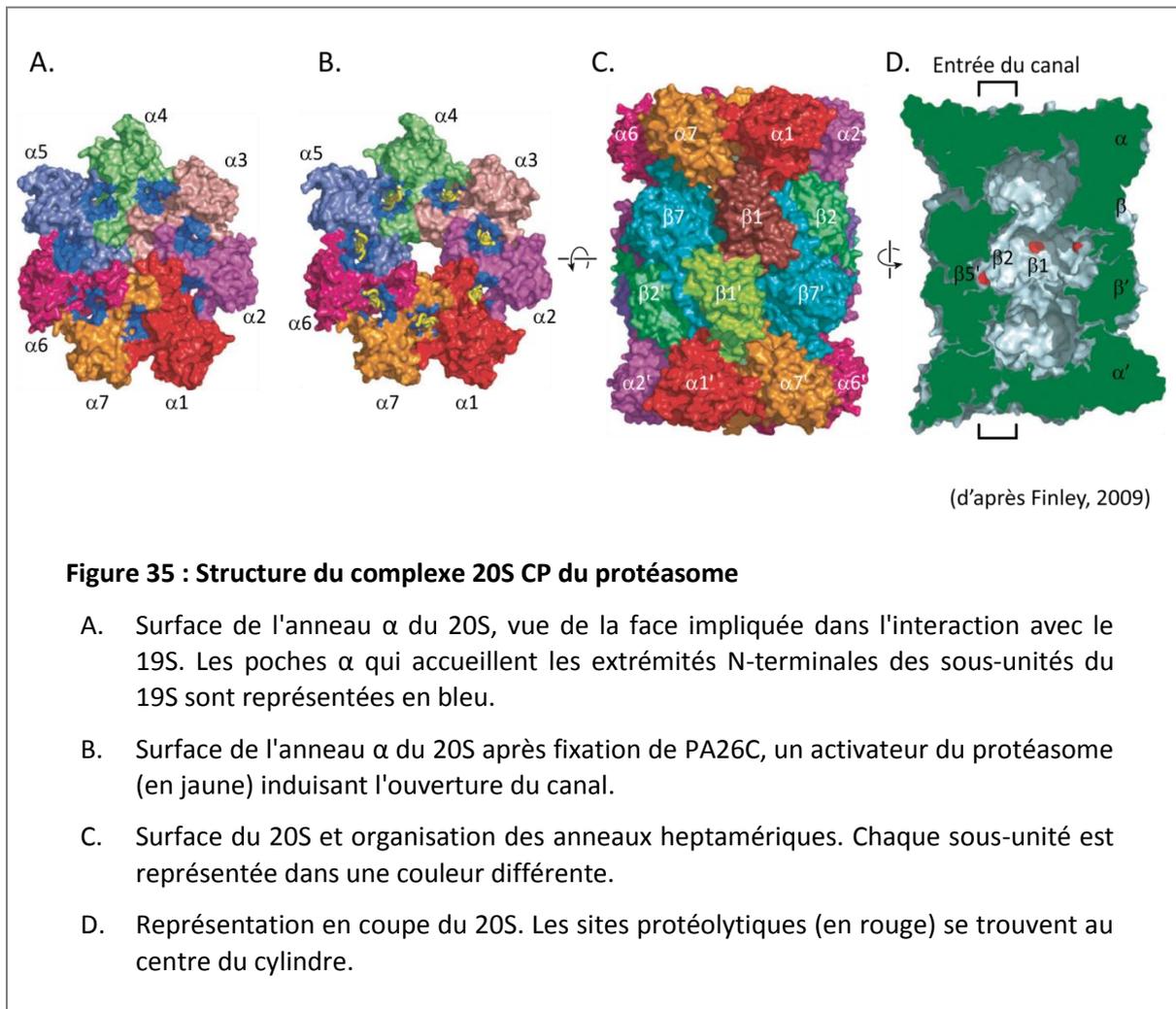


La formation du protéasome 26S est un processus complexe nécessitant l'assemblage de plus de soixante protéines ainsi que le contrôle de l'activité des sous-unités catalytiques (pour revue : Bedford et al., 2010). En outre, au moins neuf protéines à activité chaperonne, dont cinq spécifiquement dédiées à l'assemblage du 20S CP, se fixent aux différents sous-complexes et

participent à la formation du complexe final 26S (Kusmierczyk and Hochstrasser, 2008; Marques et al., 2009; Murata et al., 2009).

i. 20S CP : le sous-complexe catalytique

Le complexe 20S CP est nommé **sous-complexe catalytique** car il renferme une variété **d'activités protéolytiques**. Des données cristallographiques et de microscopie électronique montrent que ce complexe cylindrique est composée de 28 protéines formant quatre anneaux hexamériques empilés selon l'ordre α_{1-7} , β_{1-7} , β_{1-7} , α_{1-7} (Figures 34 et 35c) (pour revue : Tanaka, 2009). Les sous-unités β_1 , β_2 et β_5 possèdent respectivement des activités protéolytiques caspase-like, trypsine-like et chymotrypsine-like, ce qui leur permet de cliver un large éventail de substrats en peptides de 3 à 15 acides aminés (Bedford et al. , 2010). Les sites actifs de ces sous-unités sont exposés au niveau de la face interne du cylindre formé par le 20S CP (Figure 35d).



Les extrémités N-terminales des sous-unités α ferment les extrémités du cylindre à l'image d'une barrière et empêchent l'entrée des protéines lorsque le 20S CP est sous forme "apo" (Figure

35a). Suite à la fixation du 19S ou d'un activateur du protéasome, l'extrémité du canal du 20S CP s'ouvre et permet l'entrée des substrats (Walz et al., 1998). En raison de l'étroitesse du canal, une déstructuration préalable du substrat est nécessaire (Groll et al., 2000).

Le 20S CP peut fonctionner de manière autonome ou associé à d'autres sous-complexes régulateurs tels que le 19S RP ou les 11S (Rechsteiner and Hill, 2005). De la même façon, son assemblage peut avoir lieu indépendamment des autres sous-complexes (pour revue : Gallastegui and Groll).

Dans un premier temps, les sous-unités α s'assemblent en anneau sous la direction de quatre chaperonnes (**PAC1-4**) (Proteasome Assembly Chaperone) (Figure 36) (Hirano et al., 2006; Kusmierczyk et al., 2008). Après la dissociation de PAC3 et PAC4, une cinquième chaperonne **Ump1** (Ubiquitin-mediated proteolysis 1) participe à l'intégration progressive des sous-unités β sur l'anneau α qui sert alors d'échafaudage. L'ensemble, comportant un anneau α et un anneau β , forme un demi-20S CP. Ump1 intervient également en tant qu'"agent de contrôle" pour l'assemblage de deux demi-complexes 20S et la formation d'un complexe fonctionnel 20S CP (Murata et al., 2009). Ce nouveau complexe dégrade alors Ump1, PAC1 et PAC2.

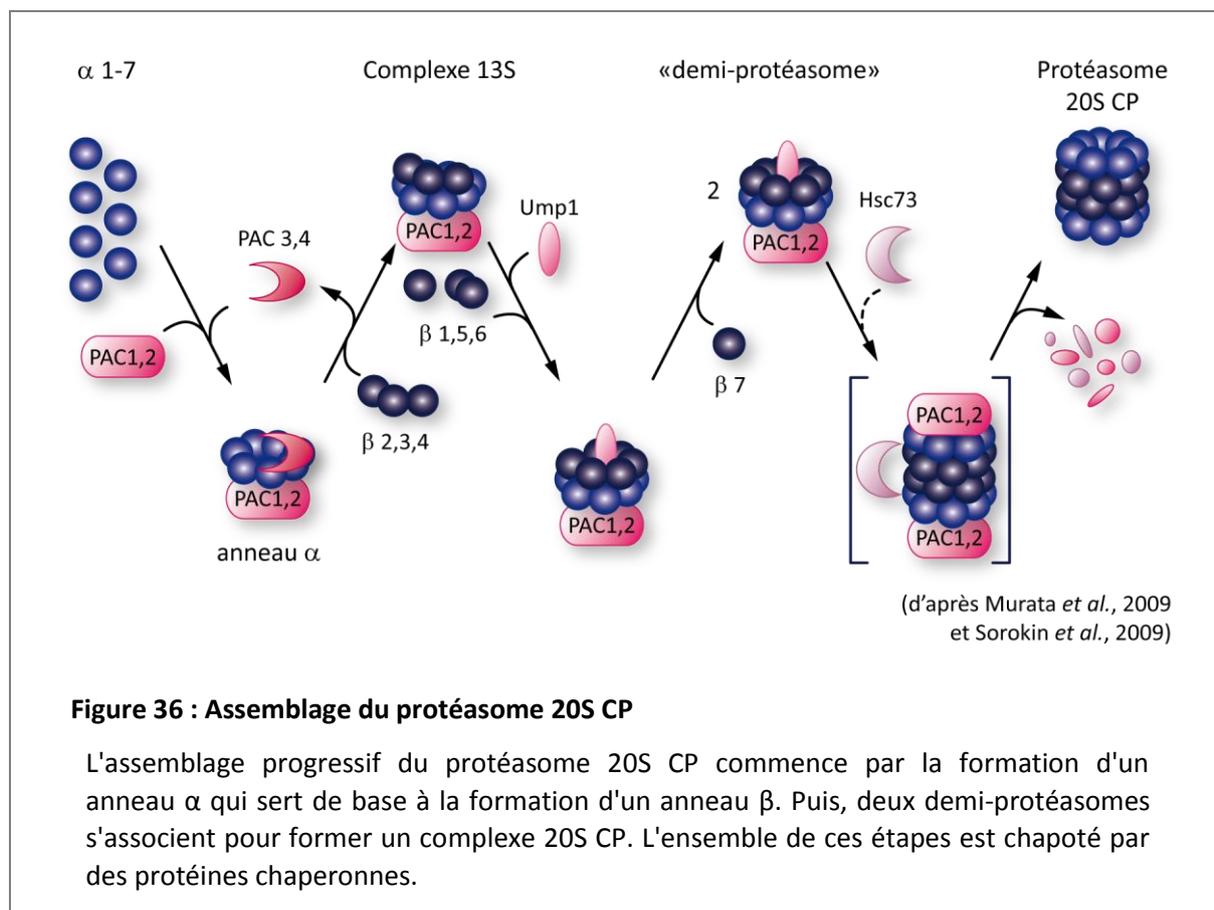


Figure 36 : Assemblage du protéasome 20S CP

L'assemblage progressif du protéasome 20S CP commence par la formation d'un anneau α qui sert de base à la formation d'un anneau β . Puis, deux demi-protéasomes s'associent pour former un complexe 20S CP. L'ensemble de ces étapes est chapoté par des protéines chaperonnes.

ii. 19S RP : le sous-complexe régulateur

Une ou les deux extrémités du 20S CP sont coiffées d'un sous-complexe 19S RP appelé **sous-complexe régulateur** car il ne porte pas d'activités protéolytiques mais **participe à la reconnaissance, à la déstructuration et à la déubiquitination** des substrats polyubiquitinés. Il participe également à **l'ouverture du 20S CP** et assure **la translocation** des protéines dans la lumière du 20S CP. Ce sous-complexe est composé de 19 sous-unités (Tableau 6) (Finley, 2009) qui forment deux sous-structures : **la base et le couvercle**.

Le couvercle est composé de neuf sous-unités Rpn3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12 et Rpn15/Sem1 (Regulatory particle of non-ATPase) (Tableau 6). Le couvercle et plus particulièrement la sous-unité **Rpn11**, intervient dans la **déubiquitination des substrats** (Yao and Cohen, 2002). Cette réaction ATP-dépendante serait régulée par les ATPases de la base *via* des mécanismes qui restent à déterminer.

La base est composée des protéines **Rpn1, Rpn2, Rpn10, Rpn13** et d'un anneau hexamérique formé par les protéines **Rpt 1-6** (Regulatory particle of triple ATPase) à activité AAA-ATPasiques (ATPases Associated with diverse cellular Activities) (Figure 34 et Tableau 6). Les extrémités C-terminales des sous-unités Rtp s'insèrent dans des poches entre les sous-unités α du 20S et induisent la translocation de leurs extrémités N-terminales puis l'ouverture de l'entrée du 20S CP (Figure 35a et b). Les AAA-ATPases participent également à la déstructuration ATP-dépendante des substrats permettant leur translocation dans le canal du 20S CP (Braun et al., 1999; Navon and Goldberg, 2001).

Quant aux sous-unités **Rpn10** et **Rpn13**, elles interviennent dans la reconnaissance des ubiquitines portées par les substrats et sont donc présentes à la périphérie de la base. **Rpn1** et **Rpn2** interagissent avec des protéines du/ou associées au protéasome et joueraient un rôle d'échafaudage (Finley, 2009).

Sous-complexe	Activité	Nom (Levure)	Nom (Humain)	Autres dénominations	
Base	AAA-ATPase	Rtp1	PSMC2	Cim5	
		Rtp2	PSMC1		
		Rtp3	PSMC4		
		Rtp4	PSMC6	Sug2	
		Rtp5	PSMC3	Sug1	
		Rtp6	PSMC5		
	Echafaudage	Rpn1	PSMD2		
		Rpn2	PSMD1		
	Récepteur d'ubiquitine	Rpn10	PSMD4		
		Rpn13	ADRM1		
Couvercle	Déubiquitinase	Rpn11	PSMD14	Pad1, Poh1	
		?	Rpn3		PSMD3
		Rpn5	PSMD12		
		Rpn6	PSMD1		
		Rpn7	PSMD6		
		Rpn8	PSMD7		Mov34
		Rpn9	PSMD4		
		Rpn12	PSMD8		
		Rpn15	PSMD9		Sem1, Dss1

(d'après Finley, 2009)

Tableau 6 : Composition et activité des sous-unités du sous-complexe régulateur 19S

L'assemblage de la base est initié par la formation de paires entre les différentes Rpt (Rpt1-Rpt2, Rpt4-Rpt5 et Rpt3-Rpt6) qui sont subordonnées par des protéines chaperonnes (Bedford et al., 2010). Dans ce processus, Rpn1 et Rpn2 joueraient un rôle d'échafaudage en interagissant avec les protéines Rpt (Park et al., 2009; Roelofs et al., 2009). Le 20S CP lui-même jouerait aussi un rôle d'échafaudage *via* ses poches qui interagissent avec les extrémités des Rpt, permettant ainsi leur bon positionnement dans l'anneau (Gillette et al., 2008; Rabl et al., 2008). Quatre chaperonnes majeures régulent l'incorporation des différents éléments du 19S RP sur le 20S CP. En effet, Nas2/p27, Nas6/gankyrin/p28, Rpn14/PAAF1 (Proteasomal ATPase-associated factor 1) et Hsm3 (enhanced spontaneous mutability)/S5b sont indispensables à l'assemblage correct des Rpt1-6 pour former l'anneau AAA-ATPase *via* des mécanismes qui ne sont pas complètement élucidés. Il est intéressant de noter qu'en absence de chaperonnes, les sous-unités Rtp peuvent former des anneaux hexamériques composés d'un seul type de sous-unités. Or, cet anneau présent dans les protéasomes eucaryotes est formé par six sous-unités différentes, ce qui suggère qu'au cours de l'évolution les chaperonnes ont été sélectionnées afin de réguler la formation de cet anneau hétéro-hexamérique (Bedford et al., 2010).

Enfin l'alignement de l'anneau Rpt du 19S RP avec l'anneau α du 20S PC stabilise l'interaction entre les deux sous-complexes. Cependant, l'alignement n'est pas parfait car l'anneau Rpt contient six sous-unités alors que l'anneau α en compte sept. Il a donc été proposé que la formation du complexe 19S RP-20S CP brise la symétrie dans l'un des deux anneaux (Finley, 2009).

D'autres modèles d'assemblage, indépendants des chaperonnes ont également été proposés et restent à confirmer mais ils débutent tous par la formation de paires de protéines Rpt (Hendil et al., 2009; Thompson et al., 2009).

iii. Rôles des modifications post-traductionnelles dans l'assemblage et l'activité du protéasome

Un certain nombre de sous-unités du 20S CP sont des cibles pour les processus de phosphorylation (Zong et al., 2008). Il en est de même de certaines protéines chaperonnes et des sous-unités du 19S RP telles que **Rpt6/SUG-1**. Ces phosphorylations seraient nécessaires à l'assemblage du 26S (Bose et al., 2004; Satoh et al., 2001). L'activité protéolytique du protéasome serait également régulée par des **phosphorylations**. Ainsi, la phosphorylation par la PKA de la sérine 120 de Rpt6/SUG-1 **active le protéasome** et à l'inverse, la phosphorylation de Rpt5 par ASK1 (**A**poptosis **S**ignal-régulation **K**inase **1**) ou la déphosphorylation de Rpt6 conduisent à une **perte d'activité** (Um et al., 2010; Zhang et al., 2007).

Les sous-unités du protéasome peuvent également être ubiquitinées. En effet, *In vivo* la **monoubiquitination de Rpn10 inhibe sa capacité à interagir avec les substrats** et diminue l'activité du protéasome (Isasa et al., 2010). En conditions de stress, Rsp5 et la DUB Ubp2 contrôlent cette ubiquitination et donc le recrutement des substrats.

iv. Autres complexes associés au 20S CP

L'activité protéolytique du sous-complexe catalytique 20S CP est régulée non seulement par l'association avec des sous-complexes régulateurs comme le 19S RP mais aussi par trois autres types de complexes (**REGy, PA200/Bolm et PA28**). Ils peuvent se fixer de façon indépendante aux extrémités du 20S CP, ce qui permet la formation de protéasomes chimériques par combinaison des trois sous-complexes régulateurs (Cascio et al., 2002; Tanahashi et al., 2000). La dégradation des substrats est alors ubiquitine-indépendante et nécessite seulement leur dénaturation et l'ouverture du 20S CP.

Un exemple de ce type de dégradation est celui de la dégradation de SRC-3 par REGy (Li et al., 2006). REGy présente une structure heptaédrique dépourvue d'activité ATPasique et de

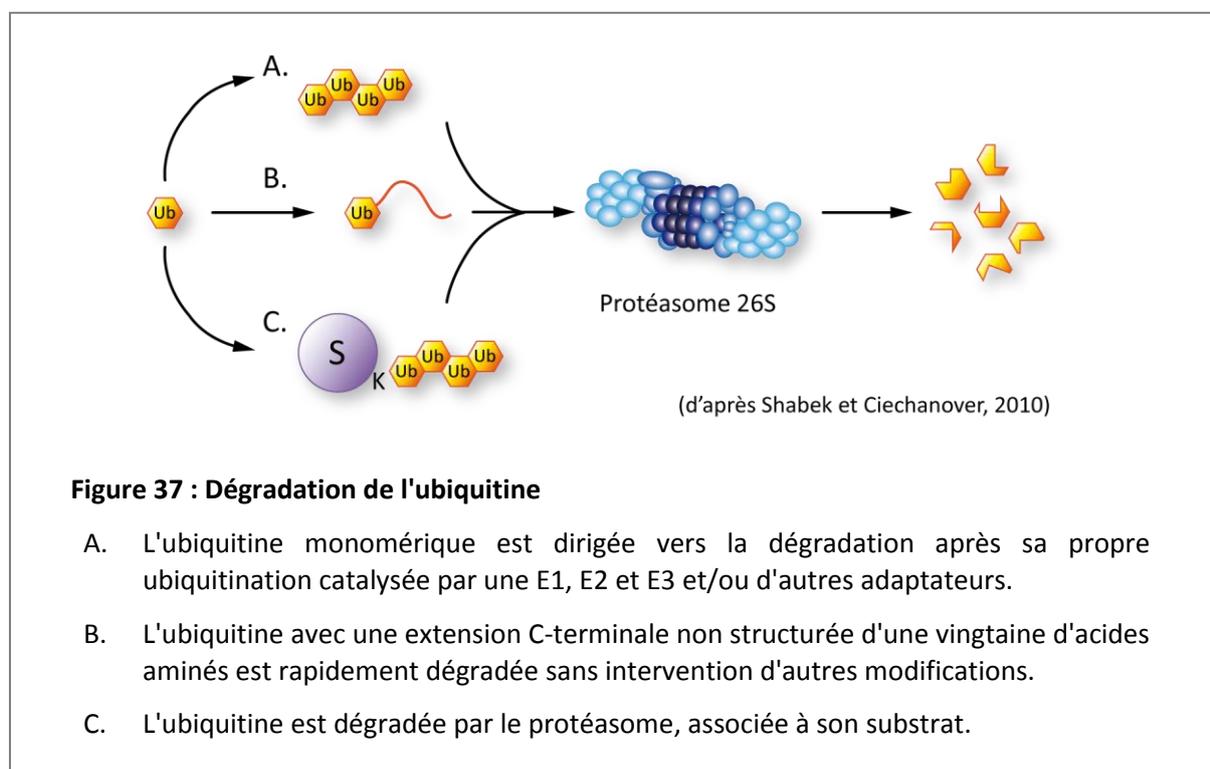
reconnaissance de l'ubiquitine. Il est cependant capable d'ouvrir le 20S CP. Ainsi, son interaction avec SRC-3 induit une perte de structure du coactivateur et l'entraîne vers la lumière du 20S CP, participant ainsi à la demi-vie de SRC-3 (Li et al., 2006). De la même façon, REGγ induit la dégradation par le 20S CP de la protéine p21 (Li et al., 2007c).

b. Rôles protéolytiques

La dégradation des protéines polyubiquitinées s'effectue en plusieurs étapes successives (reconnaissance, dénaturation, translocation et clivage par le 20S CP) abordées précédemment.

i. Reconnaissance du substrat

De manière générale, la reconnaissance du substrat est assurée par les protéines **Rpn10** et **Rpn13** du sous-complexe 19S RP (Figure 34 p89) et par trois autres protéines associées de type **UBL/UBA** (Rad23, Dsk2 et Ddi1) (Elsasser et al., 2004; Fu et al., 1998; Husnjak et al., 2008). Ces trois dernières protéines interagissent avec le protéasome *via* des domaines UBL (Ubiquitin like) et reconnaissent l'ubiquitine grâce à leur domaine UBA. Cependant, elles ne font pas partie intégrante du protéasome. Il a été proposé que les affinités relatives de ces protéines UBL/UBA pour les différentes chaînes d'ubiquitines régularaient les cinétiques de dégradation des substrats en imposant un ordre hiérarchique parmi les signaux de dégradation. De la même façon, les DUB influencent cette cinétique en déubiquitinant spécifiquement certaines protéines.



Il est intéressant de noter que l'ubiquitine, elle-même, est dégradée par le protéasome de trois façons différentes (Figure 37) : (i) sous forme de monomère, (ii) associée au substrat et (iii) sous forme de protéine de fusion avec une extension C-terminale (Shabek et al., 2009; Shabek et al., 2007).

ii. Rôles protéolytiques associés à la transcription

L'initiation de la transcription nécessite le départ des corépresseurs (Perissi et al., 2010) et le recrutement de coactivateurs et des facteurs généraux de la transcription, notamment au niveau des récepteurs nucléaires ayant fixé le ligand (Perissi and Rosenfeld, 2005). Comme décrit dans le chapitre I, la plupart des corégulateurs interagissent *via* leur NR box avec le domaine AF-2 des récepteurs, ceci écarte la possibilité d'une interaction simultanée des RN avec plusieurs corégulateurs et suggère un recrutement séquentiel au niveau des RN (Liu et al., 2001; Metivier et al., 2003; Perissi et al., 2004). Dans ce contexte, il a été proposé que le protéasome régulerait la demi-vie des facteurs de transcription et des coactivateurs afin d'assurer la **dynamique de départ et de recrutement** des différents acteurs de la transcription (Figure 38) (Dennis et al., 2005; Gianni et al., 2002a; Morris et al., 2003, pour revue : Dennis and O'Malley, 2005). Ainsi, en présence d'inhibiteurs du protéasome, le recrutement cyclique de ER et des facteurs de transcription sur les promoteurs est bloqué conduisant à une inhibition de la transcription (Reid et al., 2003). De la même façon, la dégradation de l'activateur de transcription Gal4 est requise pour la phosphorylation de l'extrémité CTD (C-Terminal Domain) de l'ARNpolIII qui permet l'activation de l'enzyme (Muratani et al., 2005).

Finalement, le protéasome interviendrait à la fin du processus transcriptionnel en **dégradant les corégulateurs et les récepteurs** (Dace et al., 2000; Lange et al., 2000) afin de "nettoyer" les promoteurs (Figure 38) (Nawaz and O'Malley, 2004).

De façon assez inattendue, le protéasome 26S a été trouvé associé à l'ARNpolIII au niveau de l'extrémité 3' des gènes, de régions de pause dans l'élongation ou de dommages causés par les UV qui sont des régions où l'ARNpolIII s'accumule (Gillette et al., 2004). Le protéasome participerait à la résolution de ces étapes de blocage et **terminerait la transcription**.

D'après l'analyse du profil de recrutement du protéasome à l'échelle du génome (genome wide) et l'étude simultanée du profil transcriptionnel dans la levure, le protéasome et ses sous-complexes n'auraient pas les mêmes fonctions **selon le promoteur considéré** (Auld et al., 2006). En effet, suite à l'inhibition du protéasome, des gènes impliqués dans la dégradation des protéines, la réponse au stress et les fonctions mitochondriales sont activés. A l'inverse, l'expression de gènes

codant les histones et de gènes impliqués dans la synthèse d'acides aminés et/ou de protéines est diminuée (Auld et al., 2006; Dembla-Rajpal et al., 2004; Fleming et al., 2002). De plus, d'après des expériences de CHIP à l'échelle du génome, les sous-unités du protéasome sont associées à la majorité des gènes sauf une centaine de gènes pour lesquels seul le 19S RP ou le 20S CP est associé (Sikder et al., 2006). Ainsi, le protéasome et ses sous-complexes auraient des fonctions différentes selon le type de promoteur et selon le(s) sous-complexe(s) impliqué(s).

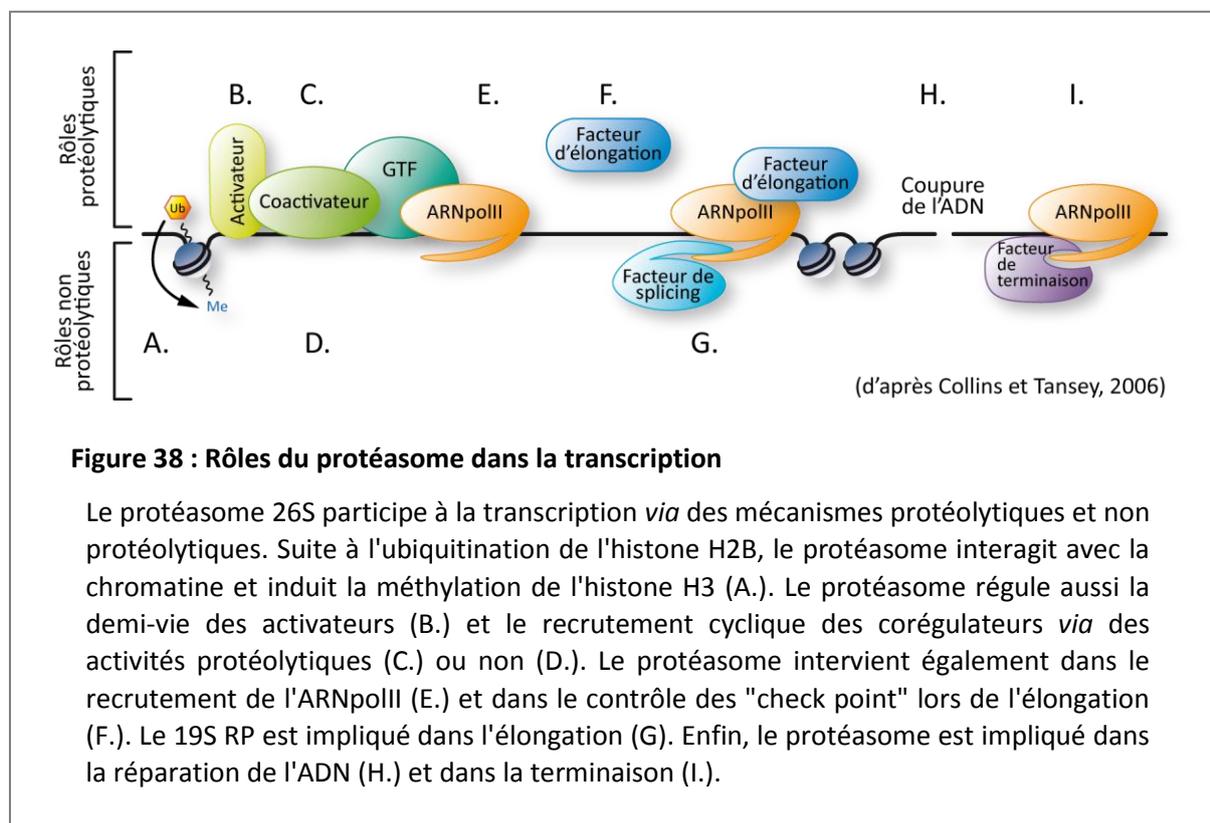


Figure 38 : Rôles du protéasome dans la transcription

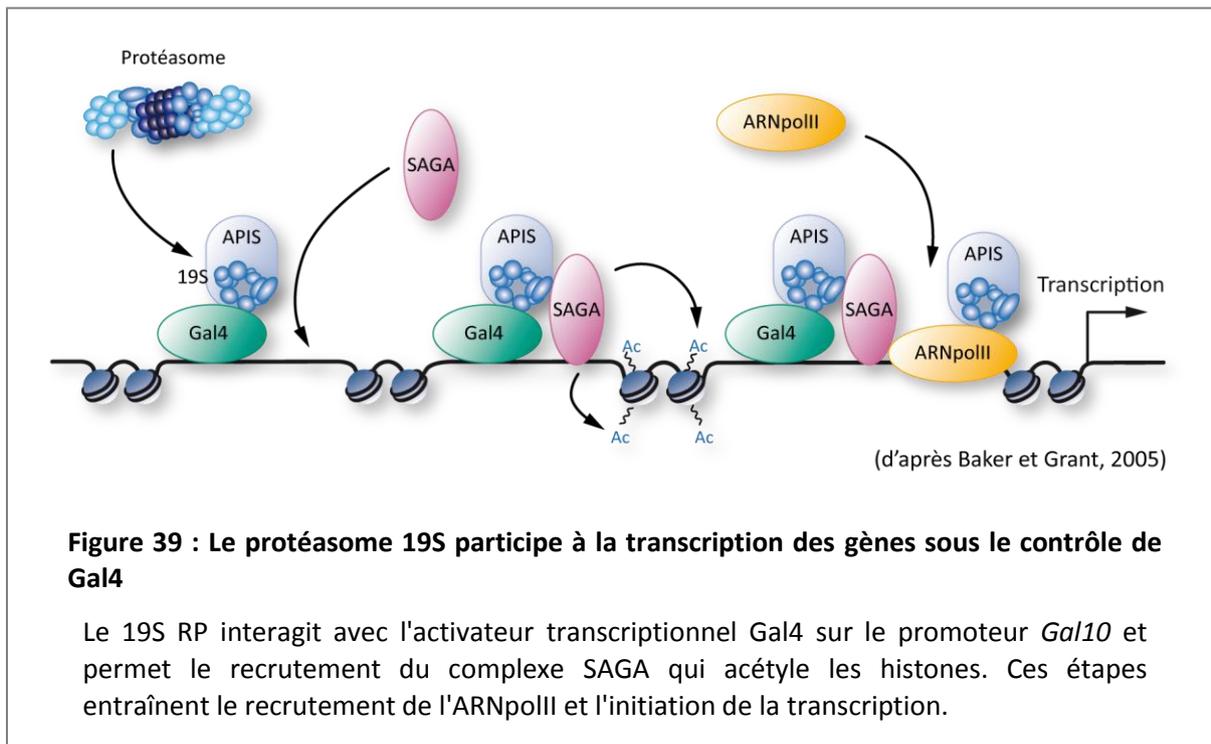
Le protéasome 26S participe à la transcription *via* des mécanismes protéolytiques et non protéolytiques. Suite à l'ubiquitination de l'histone H2B, le protéasome interagit avec la chromatine et induit la méthylation de l'histone H3 (A.). Le protéasome régule aussi la demi-vie des activateurs (B.) et le recrutement cyclique des corégulateurs *via* des activités protéolytiques (C.) ou non (D.). Le protéasome intervient également dans le recrutement de l'ARNpolIII (E.) et dans le contrôle des "check point" lors de l'élongation (F.). Le 19S RP est impliqué dans l'élongation (G.). Enfin, le protéasome est impliqué dans la réparation de l'ADN (H.) et dans la terminaison (I.).

En conclusion, le **complexe 26S participe *via* ses fonctions protéolytiques à la transcription**, aussi bien au niveau de **l'initiation** en assurant le départ des corépresseurs et le recrutement cyclique des différents facteurs de transcription, que pendant **l'élongation** en résolvant les blocages de l'ARNpolIII dans des contextes promoteur-spécifiques ainsi que dans **la terminaison**.

c. Rôles non protéolytiques

Via le sous-complexe 19S RP, le protéasome est aussi impliqué dans la transcription *via* des processus non protéolytiques. En effet, des expériences de CHIP sur le promoteur *GAL1-10* de levure ont montré que Gal4 recrute rapidement les sous-unités ATPasiques de la base du 19S RP (**SUG-1/Rtp6**, SUG-2/Rtp4 et Yta1/Rtp5 du 19S RP) et non celles du couvercle ou du 20S CP (Figure 39) (Gonzalez et al., 2002). De plus, des expériences de CHIP à l'échelle du génome ont révélé la présence du sous-complexe 19S RP au niveau des promoteurs des gènes fortement transcrits (Auld et al., 2006).

Il a alors été proposé que le complexe **APIS** (AAA Protein Independent of the 20S) composé des six ATPases du 19S RP et probablement d'autres protéines, participerait à la transcription des gènes *via* les activités chaperonnes portées par les sous-unités ATPasiques (Sun et al., 2002). APIS remodelerait également les complexes d'élongation associés à l'ARNpolIII et faciliterait la résolution des blocages de l'ARNpolIII lors des pauses d'élongation (Ferdous et al., 2001; Gonzalez et al., 2002).



En conclusion, le protéasome et ses sous-complexes sont impliqués dans les **différentes étapes de la transcription** aussi bien directement *via* leur fixation au niveau des promoteurs qu'indirectement *via* la dégradation des facteurs de transcription (Lipford and Deshaies, 2003; Muratani and Tansey, 2003). Les processus protéolytiques et non protéolytiques **auraient lieu en parallèle et coopèraient** lors de la transcription (Lassot et al., 2007).

d. SUG-1 : sur tous les fronts

Les fonctions des sous-unités du protéasome, considérées individuellement, sont encore peu connues. Beaucoup d'équipes se sont penchées sur le rôle de SUG-1, sous-unité de la base du 19S RP. En effet, cette protéine intervient aussi bien dans des processus protéolytiques que non-protéolytiques.

i. SUG-1 et la protéolyse

SUG-1 participe à la dégradation de facteurs de transcriptions (Sp1 et SRC-3) (Su et al., 2000) (Publication 1). Il participe également à la dégradation des récepteurs nucléaires comme ER, TR, VDR

et RAR γ en interagissant de façon ligand-dépendante avec leur domaine AF-2 et en entraînant leur dégradation (Gianni et al., 2002a; Masuyama and Hiramatsu, 2004; Masuyama et al., 2002; Masuyama and MacDonald, 1998; vom Baur et al., 1996).

Suite à un criblage double hybride, il a aussi été montré que SUG-1 interagit *via* sa région C-terminale, comportant le site AAA-ATPasique, avec la région N-terminale de Prp19 impliquée, en plus de son activité E3 ligase, dans la réparation de l'ADN et l'épissage (Cheng et al., 1993; Henriques et al., 1989). Cette interaction permettrait de recruter les substrats ubiquitinés de Prp19 afin de les diriger vers la dégradation par le protéasome (Sihn et al., 2007).

ii. SUG-1 et la transcription

Initialement, SUG-1 a été identifié chez *S.cerevisia* comme un activateur transcriptionnel (Swaffield et al., 1992). L'équipe du Dr. Johnston a montré que SUG-1 participe à la transcription au sein du complexe APIS qui comporte les autres sous-unités de la base du 19S comme nous l'avons abordé précédemment *via* des processus non protéolytiques. De plus, récemment il a été montré qu'une diminution de l'expression de SUG-1 induit une diminution de l'expression de gènes et notamment les gènes du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) (Bhat et al., 2008).

SUG-1 participerait aussi bien à l'initiation de la transcription qu'à l'élongation. En outre, SUG-1 interagit avec TBP (Makino et al., 1999), avec des facteurs de transcription (TFIIH, FACT/cdc68, TFIID, SRC-3) (Sun et al., 2002; Weeda et al., 1997) (Publication 1) et est également indispensable au recrutement du complexe SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase) au niveau des promoteurs de gènes de levure (Lee et al., 2005). En effet, suite à la monoubiquitination de l'histone H2B, le complexe 19S est recruté, facilitant ensuite la méthylation des histones H3. Puis SUG-1 et Rpt4 recrutent les complexes histone-acétyltransferase/SAGA qui acétylent H3 et activent la transcription (Figure 39) (Ezhkova and Tansey, 2004).

Enfin, SUG-1 interagit de façon ligand-dépendante avec de nombreux récepteurs nucléaires dont les RAR (vom Baur et al., 1996) *via* son activité hélicase (Fraser et al., 1997). SUG-1 entraînerait une altération locale de l'ADN pour faciliter le remodelage de la chromatine (Fraser et al., 1997).

En conclusion, SUG-1 serait une **plaque tournante** qui permettrait l'activation de la transcription et/ou la dégradation des coactivateurs et/ou des récepteurs nucléaires.

B. Dégradation des RAR par le protéasome

Les RAR sont dégradés par le protéasome en réponse à l'AR. Les travaux de l'équipe montrent que dans le cas de RAR α , cette dégradation est indépendante de la présence du NTD et de

son état de phosphorylation mais **dépendante de AF-2**. Il a donc été proposé que le domaine AF-2 recruterait la machinerie d'ubiquitination et/ou de dégradation (Kopf et al., 2000). L'hétérodimérisation et la fixation à l'ADN sont également requises pour cette dégradation (Kopf et al., 2000; Tanaka et al., 2001; Zhu et al., 1999a). La dégradation de RAR α dépendrait aussi d'interactions avec d'autres protéines. Ainsi en absence de ligand, la phosphorylation de la sérine 77 de RAR α permettrait l'interaction avec **Pin1** qui diminue la **demi-vie du récepteur indépendamment du ligand** (Brondani et al., 2005). En effet, l'utilisation de siRNA ciblant Pin1 ou d'inhibiteurs de Pin1 conduit à une augmentation du niveau protéique basal de RAR α *via* sa stabilisation. Dans ces conditions, les gènes cibles de l'AR sont plus rapidement induits en réponse à l'AR (Gianni et al., 2009). Pin1 agirait en amont de la machinerie d'ubiquitination *via* des changements conformationnels du récepteur qui deviendrait alors plus accessible aux complexes d'ubiquitine ligases (Gianni et al., 2009).

En ce qui concerne le sous-type RAR γ 1, sa dégradation dépend non seulement du domaine **AF-2** mais aussi **de la phosphorylation du NTD et implique une coordination entre phosphorylation et ubiquitination** (Gianni et al., 2002a; Kopf et al., 2000). En effet, la phosphorylation de la sérine 77 par la P38MAPK et de la sérine 79 par cdk7 en réponse à l'AR servirait de point de "nucléation" pour l'ubiquitination du récepteur au niveau d'un site qui n'a pas encore été défini (Boudjelal et al., 2000; Gianni et al., 2002a; Gianni et al., 2002b). Ainsi, suite à la substitution des deux sérines en alanines, RAR γ n'est plus ni ubiquitiné, ni dégradé en réponse à l'AR (Gianni et al., 2003; Kopf et al., 2000). Il est intéressant de noter qu'en absence du domaine AF-1, RAR γ devient dépendant de son partenaire d'hétérodimérisation, aussi bien pour la transcription que pour sa dégradation. Dans ce cas, la dégradation du récepteur ne fait plus intervenir le protéasome mais des protéases encore non identifiées (Gianni et al., 2003). Quant au domaine AF-2, il interviendrait dans la dégradation de RAR γ , *via* le recrutement de SUG-1 (Gianni et al., 2002a). L'étude de la dégradation de RAR γ a également mis en lumière un autre aspect du rôle du protéasome dans la réponse à l'AR et notamment au niveau transcriptionnel. En effet, l'inhibition de l'ubiquitination et/ou de la dégradation du récepteur abroge la transcription des gènes cibles (Gianni et al., 2002a). Ainsi, de nouveau, le protéasome joue un double rôle : d'une part, en participant à l'activation de la transcription et *via* le recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Lin et al., 2002) et d'autre part, en induisant la fin du signal rétinolde *via* la dégradation des récepteurs.

C. Dégradation de SRC-3 par le protéasome

En réponse à l'AR, SRC-3, après avoir été lui aussi impliqué dans des cycles de transcription, est dégradé par le système ubiquitine-protéasome. Cette dégradation dépend de sa **phosphorylation**

par la **p38MAPK** activée par l'AR (Chai et al., 2009; Gianni et al., 2006) ainsi que du **sous-type de RAR** avec lequel le coactivateur interagit. En effet, la dégradation de SRC-3 en réponse à l'AR n'a lieu qu'en présence de RAR α associé avec RXR à un RARE (Gianni et al., 2006). Il est intéressant de noter qu'à l'inverse, la dégradation de RAR α en présence d'AR ne dépend pas de SRC-3 (Gianni et al., 2006). La régulation de la dégradation de SRC-3 en réponse à l'AR fait l'objet de cette thèse et est détaillée plus loin (cf résultats). Cependant, je décrirai ici, ce qui est connu dans le contexte de la dégradation de SRC-3 induite par les œstrogènes et de sa demi-vie phospho-indépendante.

A l'image des RAR, la transactivation des gènes cibles de ER nécessite l'action protéolytique du protéasome 26S afin de réguler la dynamique de recrutement des coactivateurs puis l'arrêt du système (Lonard et al., 2000). En réponse aux œstrogènes, SRC-3 est dégradé par le protéasome (Lonard et al., 2004) et son état de phosphorylation joue un rôle clef dans ce processus (pour revue : Garabedian and Logan, 2008). En effet, selon les résidus et les kinases impliquées, la **phosphorylation** conduit soit à la **dégradation** (Wu et al., 2007) soit à la **stabilisation** du coactivateur (Yi et al., 2008) (cf paragraphe III.B.2.a).

1. Phosphorylation, phospho-détron et dégradation de SRC-3

SRC-3 renferme plusieurs régions impliquées dans sa dégradation de manière phospho-dépendante qui sont appelées phospho-détron. En N-terminal, la **région C** localisée entre les domaines bHLH et PAS est définie comme un phospho-détron. En effet, la phosphorylation des sérines 101 et 102 participe à la dégradation de SRC-3 et leur déphosphorylation par la **phosphatase PP1** inhibe le recrutement du protéasome et stabilise le coactivateur (Li et al., 2008). A noter que la délétion du domaine bHLH ou la mutation de la lysine 17 et de l'arginine 18 appartenant à ce domaine entraîne une stabilisation du coactivateur (Li et al., 2007a).

La **région centrale** renferme plusieurs sites de phosphorylation. Ainsi, comme décrit dans le paragraphe III.B.2.a, la kinase **GSK3** phosphoryle SRC-3 sur les sérines 505 et 509, ce qui constitue le signal d'ubiquitination par un complexe CRL1 renfermant la E3 **Fbw7** qui conduit à la dégradation du coactivateur en réponse aux œstrogènes (Wu et al., 2007). A l'inverse, **Akt** qui appartient à la même voie Akt/PKB-GSK3, phosphorylerait SRC-3 au niveau de la région 673-979 et empêcherait l'ubiquitination et la dégradation du coactivateur (Ferrero et al., 2008). Récemment, la phosphorylation de la sérine 601 proche du **domaine NID** par la kinase **CK1 δ** a été mise en évidence (Giamas et al., 2009). En plus de moduler l'interaction entre ER et SRC3, cette phosphorylation protège SRC-3 de la dégradation en réponse à E2. La région centrale contient également un deuxième phospho-détron, entre les résidus 1031 et 1097, riche en acides aminés acides (Asp et Glu) et hydrophobes (Leu et Ile). La phosphorylation de cette région par la kinase **PKC ξ** induit des

changements conformationnels conduisant à l'exposition de surfaces chargées qui entraînent des répulsions électrostatiques avec le protéasome, empêchant la dégradation de SRC-3 (Yi et al., 2008).

Enfin, d'autres changements conformationnels, comme ceux générés par **Pin1**, induisent le recrutement du protéasome et diminuent la demi-vie du coactivateur. Pin1 interagit avec différentes régions phosphorylées de SRC-3, mais aucun domaine particulier n'a été mis en évidence (Yi et al., 2005).

A noter que SRC-3 sert également de plateforme pour le recrutement de la E3 ubiquitine ligase **E6-AP** entraînant la dégradation de ER et non du coactivateur en présence d'agonistes (Shao et al., 2004).

En conclusion, l'ensemble de ces données met en exergue l'action ordonnée des différentes kinases/phosphatases en réponse aux œstrogènes et le rôle double des phosphorylations qui en découlent. En effet, l'ensemble des phosphorylations semble former un code à l'image du code histone pouvant réguler d'autres modifications post-traductionnelles, telles que l'ubiquitination pour *in fine*, conduire à la dégradation du coactivateur *via* la régulation d'interactions. De plus, avant de participer à la dégradation de SRC-3, les phosphorylations modulent son activation et ses fonctions transcriptionnelles. Ces modifications apportent donc une **régulation globale** de l'activité du coactivateur.

A l'heure actuelle, les sites de phosphorylation et d'ubiquitination régissant la dégradation de SRC-3 en réponse à l'AR n'ont pas encore été identifiés. Il serait intéressant d'étudier si les modèles de régulations impliqués dans la promotion ou dans la prévention de la dégradation de SRC-3 proposés dans le contexte de ER (Figures 22 p69 et 23 p70) sont transposables aux rétinoïdes. A priori, ces mécanismes semblent également faire intervenir des processus de phosphorylation en réponse à l'AR comme l'ont amorcé les travaux de l'équipe (Gianni et al., 2006).

2. Demi-vie de SRC-3 indépendante de la phosphorylation

En parallèle de la dégradation induite par les œstrogènes, le niveau de SRC-3 est également régulé de manière constitutive. Dans ce contexte, **REGγ** abordé précédemment, interagit avec le domaine HAT de SRC-3 et participe à sa dégradation de manière ubiquitine et ATP-indépendante (Li et al., 2006).

D'autres études *in vitro* ont mis en évidence l'implication de certaines E2 dans l'ubiquitination et la dégradation de SRC-3 de manière indépendante des cascades de phosphorylation décrites plus haut. Ainsi, **UBC2-4**, **UBC5** et **UBC8** pourraient participer à l'ubiquitination du coactivateur (Yan et al., 2003). D'autres travaux récents réalisés avec des cellules

cancéreuses mammaires (MDA-MB-231) montrent que la E3 **CHIP** interagit avec SRC-3 et entraîne son ubiquitination et sa dégradation (Kajiro et al., 2009). Par contre, dans les cellules d'adénocarcinome pancréatique (COLO 357 PL), SRC-3 interagit *via* la région C-terminale (723-1034) avec **E6-AP** et est dégradé par le protéasome en l'absence de sérum dans le milieu de culture (Mani et al., 2006).

En conclusion, en fonction du **contexte cellulaire et des conditions de culture/stimuli**, la demi-vie de SRC-3 ne fait pas intervenir les mêmes mécanismes que ceux impliqués dans la dégradation du coactivateur en réponse aux œstrogènes.

Objectifs

La thématique centrale de l'équipe du Dr. Cécile Rochette-Egly est basée sur l'étude des modifications post-traductionnelles (PTM) des RAR et plus particulièrement de leur phosphorylation. Depuis la découverte des **RAR en tant que phosphoprotéines**, l'équipe a identifié un certain nombre de sites de phosphorylation ainsi que les kinases associées.

L'équipe a montré qu'en réponse à l'AR, les RAR et leur coactivateur SRC-3 sont rapidement **phosphorylés** (Bastien et al., 2000; Gianni et al., 2006; Rochette-Egly et al., 1997) et que ces phosphorylations jouent un rôle clé dans l'interaction des RAR avec leurs corégulateurs ainsi que dans la transcription des gènes cibles de l'AR (Publication 2). L'équipe a également montré que RAR α , RAR γ et SRC-3 sont **ubiquitinés et dégradés** par le protéasome (Gianni et al., 2002a; Kopf et al., 2000; Rochette-Egly, 2005). De manière intéressante, SUG-1, une sous-unité du sous-complexe protéasique 19S qui interagit de façon ligand-dépendante avec les RAR (vom Baur et al., 1996) s'est avérée participer à leur dégradation. Dans un premier temps, cette dégradation a été corrélée à la fin du signal rétinol. Cependant, de façon tout à fait intéressante, il s'est avéré que le protéasome, en particulier le 19S RP, participe à la régulation de la transcription *via* des mécanismes non protéolytiques.

L'ensemble de ces données soulève un certain nombre de questions :

- les phosphorylations de RAR et de SRC-3 participent-elles à leur dégradation et comment? Les phosphorylations sont des PTM très rapides et réversibles qui peuvent, entre autres, induire des changements structuraux affectant des domaines adjacents favorisant aussi l'association/dissociation d'interactants, tels que les composants du protéasome et ainsi régir la stabilité et le fonctionnement des protéines.
- quelle(s) fonction(s) occupe le protéasome dans la réponse à l'AR?

Dans ce contexte, **les objectifs de ma thèse** ont été de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus de dégradation de RAR α et de SRC-3 en réponse à l'AR, à savoir :

- déterminer si ces processus sont précédés de variations de l'état d'ubiquitination.
- caractériser les E3 ubiquitine ligases impliquées.
- analyser l'interdépendance entre phosphorylation, ubiquitination et la dégradation.
- étudier l'implication des rôles protéolytiques et non protéolytique du protéasome dans la transcription des gènes cibles de RAR α .

Afin de répondre à ces questions, des approches novatrices ont été mise en place avec l'aide des nouvelles plateformes techniques de l'IGBMC à savoir :

- la mise en place d'une collaboration avec la plateforme de séquençage haut débit de l'IGBMC pour réaliser le criblage d'une banque de siRNA ciblant des E3 ubiquitine ligases.
- la préparation d'anticorps reconnaissant spécifiquement les formes phosphorylées de SRC-3 (service de production d'anticorps monoclonaux) et la mise au point de l'analyse des protéines phosphorylées par purification sur colonne d'affinité.
- la mise au point des conditions de culture en masse de cellules en suspension (service de culture cellulaire) dans le but d'analyser par spectrométrie de masse (plateforme de protéomique) des complexes protéiques associés à RAR α .

Résultats

I. Phosphorylation et protéasome : de l'activation à la dégradation

A. Phosphorylation de RAR α : clé de voûte de la transcription des gènes cibles (Publication 2)

1. Effets non génomiques de l'AR et de RAR α

Les travaux de l'équipe avaient mis en évidence l'activation de la p38MAPK en réponse à l'AR (Gianni et al., 2002a). J'ai confirmé que cette voie de signalisation est activée rapidement (dès 5 min) dans diverses lignées cellulaires (MCF7, HeLa, MEF et F9) suite à l'addition d'AR ou d'agonistes de RAR α . De façon intéressante, cette activation n'est pas observée dans des MEF invalidées pour les trois RAR mais est restaurée uniquement lors de la réexpression de RAR α . Ces effets suggèrent donc un **effet non génomique de l'AR mettant en jeu RAR α ayant fixé un ligand**.

2. RAR α est phosphorylé par MSK1 et cdk7

Une des cibles de la p38MAPK est la kinase MSK1. En effet, l'activation de cette dernière est abrogée en présence d'un siRNA ou d'un inhibiteur spécifique de la p38MAPK, confirmant cette cascade. Nous avons montré après purification des protéines phosphorylées par colonne d'affinité que RAR α est une cible pour MSK1 en réponse à l'AR. En effet, le LBD de RAR α renferme une sérine, S369, qui appartient à un motif riche en arginines et en lysines et qui correspond à un site consensus pour de nombreuses kinases dont MSK1. De plus la sérine 369, fortement exposée, appartient à la boucle L9-10 du LBD à proximité de la boucle L8-9 qui correspond avec le début de H9 au domaine de fixation de la cycline H (Figure 41) (Gaillard et al., 2006).

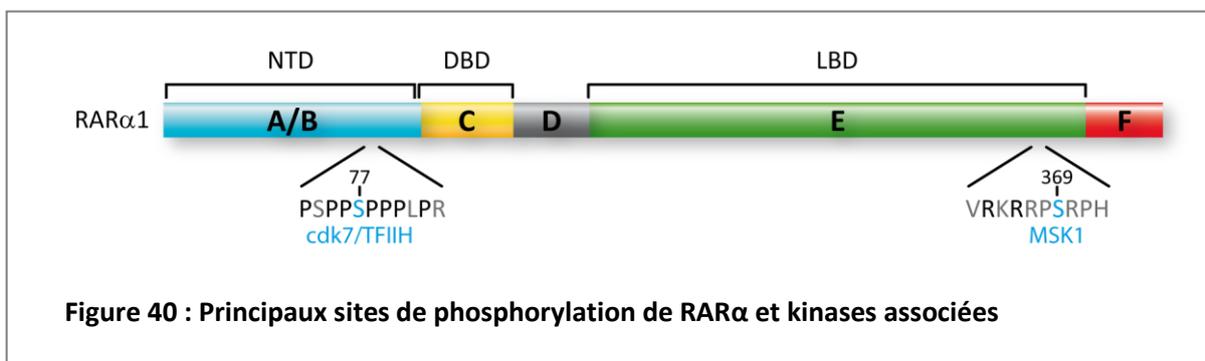


Figure 40 : Principaux sites de phosphorylation de RAR α et kinases associées

Nous avons montré que la phosphorylation de cette sérine 369 est le signal qui permet le recrutement de la cycline H et par voie de conséquence, la phosphorylation de la sérine 77 par la

kinase cdk7 associée. D'où la conclusion que l'activation de la voie p38MAPK/MSK1 est le point de départ d'une cascade de phosphorylation ciblant RAR α .

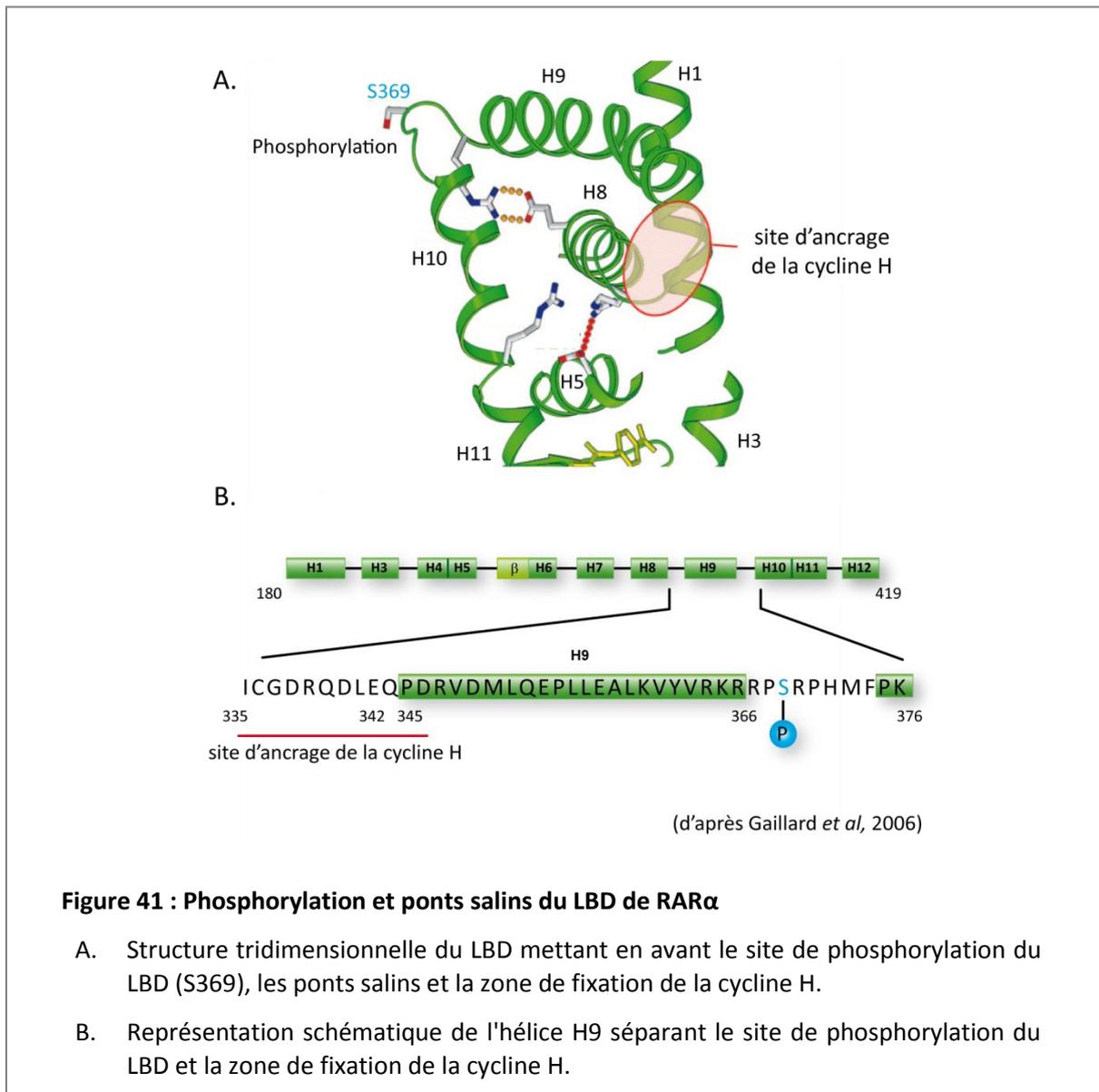


Figure 41 : Phosphorylation et ponts salins du LBD de RAR α

- Structure tridimensionnelle du LBD mettant en avant le site de phosphorylation du LBD (S369), les ponts salins et la zone de fixation de la cycline H.
- Représentation schématique de l'hélice H9 séparant le site de phosphorylation du LBD et la zone de fixation de la cycline H.

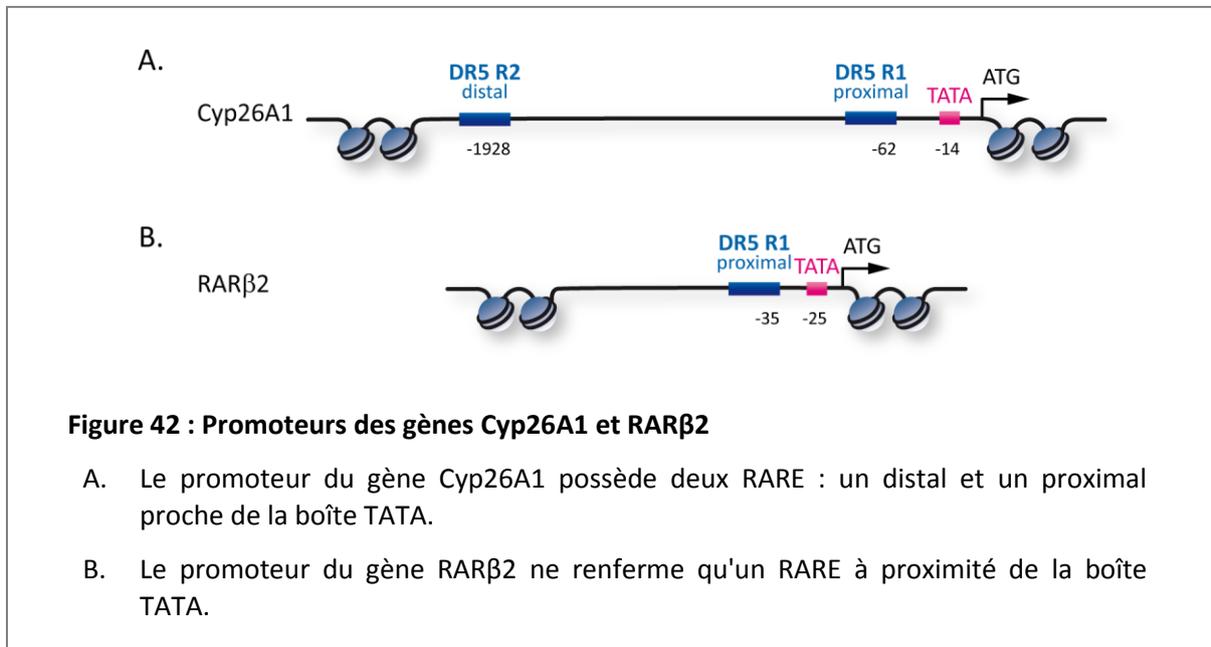
3. Phosphorylation de RAR α et transcription

Nous avons montré que la voie p38MAPK/MSK1 est indispensable à la transcription des gènes cibles de l'AR *via* la phosphorylation de RAR α et des histones.

a. Recrutement phospho-dépendant de RAR α à l'ADN

L'utilisation de fibroblastes murins exprimant RAR α muté au niveau des sérines 77 (S77A) ou 369 (S369A) dans un fond RAR (α , β , γ) nul, a permis d'étudier l'impact de la phosphorylation de ces résidus sur le recrutement de RAR α à l'ADN dans des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Nous avons analysé le recrutement de RAR α au niveau des promoteurs des gènes

cibles Cyp26A1 et RAR β 2. Le promoteur du gène Cyp26A1 comprend deux RARE : un distal (DR5 R2) et un proximal (DR5 R1) à proximité de la boîte TATA (Figure 42) qui *in vivo*, agissent de façon synergique dans la réponse à l'AR (Loudig et al., 2000). Quant au promoteur de RAR β 2, il ne possède qu'un seul RARE (DR5R1) à proximité de la boîte TATA (Figure 42).



Nous avons montré qu'en absence d'AR, une très faible fraction des RARE est occupée par RAR α . Ceci remet en question le modèle classique selon lequel, tous les promoteurs seraient occupés en absence d'AR (Martens et al., 2010). En effet, RAR α est très difficile à détecter au niveau du RARE du promoteur du gène RAR β 2 et du RARE distal du gène Cyp26A1. Par contre, en réponse à l'AR, nous avons observé une **augmentation rapide et transitoire** (entre 30 et 55 min) de l'occupation de ces RARE par RAR α . Cependant, en absence d'AR, le promoteur proximal du gène Cyp26A1 est déjà occupé par RAR α associé au corépresseur SMRT. Dans ce cas et selon le modèle classique, la fixation de l'AR induit la dissociation de SMRT et nous observons tout de même une augmentation de l'occupation du RARE par RAR α .

De manière intéressante, RAR α est recruté sous forme d'un complexe associé à TFIIH et ce recrutement dépend de la phosphorylation de la sérine 77. Ainsi, la phosphorylation de cette sérine serait nécessaire à l'interaction entre le complexe RAR α /TFIIH et l'ADN.

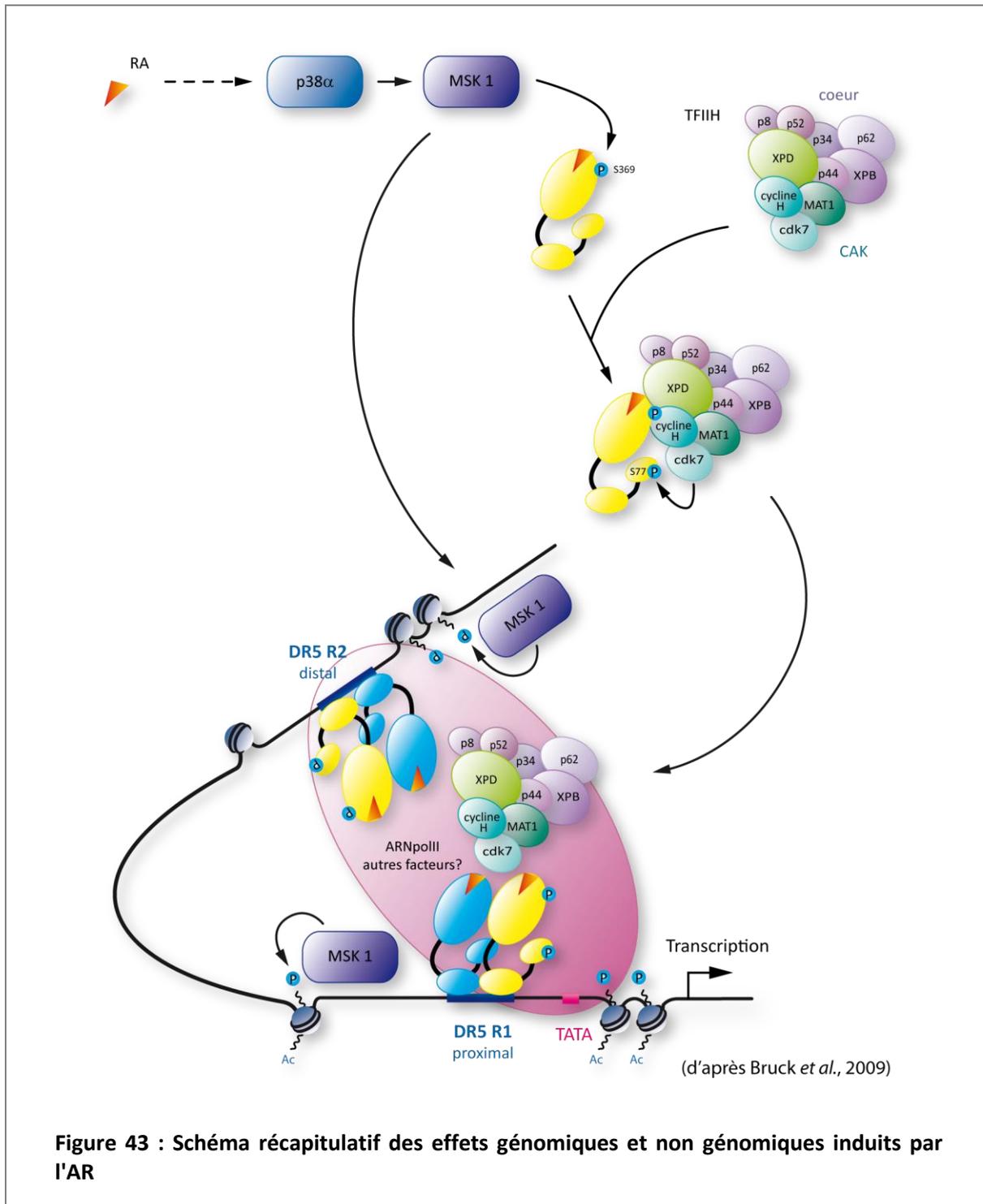


Figure 43 : Schéma récapitulatif des effets génomiques et non génomiques induits par l'AR

D'un point de vue transcriptionnel, le recrutement de TFIIF sur le RARE distal du promoteur du gène Cyp26A1, éloigné de la boîte TATA n'avait pas beaucoup de sens. Des expériences de "ChIP Loop Assay" ont alors montré que lorsque le complexe RARα/TFIIF est recruté, le RARE proximal et la boîte TATA s'associent au RARE distal *via* une **boucle** (Figure 43). Là encore, la formation de cette boucle dépend de la phosphorylation de RARα au niveau de la sérine 77. Ces données suggèrent que RARα phosphorylé servirait de plateforme pour le recrutement de la machinerie transcriptionnelle.

b. Phosphorylation des histones H3 par MSK1 : préparation de la chromatine

Bien que RAR α soit phosphorylé très rapidement par MSK1 en réponse à l'AR (dès 15 min), son recrutement au niveau des promoteurs des gènes cibles n'est observé qu'après 30-60 min. D'où l'hypothèse que le promoteur ne serait pas accessible au récepteur. En d'autres termes, la chromatine ne serait pas prête et serait maintenue dans un état silencieux *via* la méthylation et/ou l'absence d'acétylation des queues des histones (Gillespie and Gudas, 2007).

En fait, nous avons montré qu'en réponse à l'AR, MSK1 est rapidement recrutée (entre 5 et 15 min) au niveau des zones entourant les RARE, **indépendamment de RAR α** , et phosphoryle les histones H3 comme décrit dans le paragraphe III.B.1.c. La combinaison de ces évènements préparerait la chromatine pour le recrutement de RAR α , de TFIIII puis de l'ARNpolIII, afin d'initier la transcription des gènes cibles de l'AR.

B. SRC-3 et SUG-1 : deux corégulateurs transcriptionnels de RAR α (Publication 1)

La transcription des gènes cibles de l'AR est potentialisée par des coactivateurs, comme nous l'avons mentionné dans l'introduction. Des travaux de l'équipe avaient montré que : (i) SRC-3 est un coactivateur des RAR, (ii) SUG-1, une sous-unité du protéasome est aussi un corégulateur transcriptionnel des RAR (Gianni et al., 2006) avec lesquels il interagit (vom Baur et al., 1996) (iii) SRC-3 et les RAR sont dégradés par le protéasome en réponse à l'AR (Gianni et al., 2006; Kopf et al., 2000).

J'ai donc cherché à savoir quels étaient les rôles du protéasome et plus particulièrement de SUG-1, dans l'activité transcriptionnelle de RAR α ainsi que dans la dégradation du récepteur et de son coactivateur SRC-3.

1. SRC-3 et SUG-1 modulent la transcription des gènes cibles

Dans un premier temps, j'ai confirmé par qRT-PCR, le **rôle activateur de SRC-3** dans la transcription des gènes cibles de l'AR. Ainsi, la surexpression de SRC-3 augmente l'expression des ARNm des gènes cibles de RAR α dans les cellules MCF7 (Gianni et al., 2006) alors qu'un siRNA ciblant SRC-3 a l'effet inverse (Publication 1). Il est intéressant de noter que cet effet est spécifique du coactivateur SRC-3. En effet, la suppression ou la surexpression des autres coactivateurs SRC-1 et SRC-2 n'ont pas d'effet.

De façon assez étonnante, les mêmes observations ont été faites lors de l'utilisation d'un siRNA dirigé contre SUG-1. Cependant, **SUG-1 semble jouer un rôle plus complexe**. En effet, contrairement à ce qui était attendu, la surexpression de SUG-1 diminue l'expression des gènes cibles de RAR α . Ainsi, le niveau d'expression de SUG-1 semble être important dans la transcription des gènes cibles de l'AR puisqu'un excès ou un trop faible niveau de SUG-1 bloque leur transactivation.

2. *In vivo*, SRC-3 et SUG-1 interagissent avec RAR α

Suite à ces premiers résultats, j'ai disséqué de manière plus approfondie l'interaction de SRC-3 et SUG-1 avec RAR α . Des expériences d'immunoprécipitation en conditions endogènes ou après surexpression des corégulateurs ont montré que, *in vivo*, **l'interaction de RAR α avec SRC-3 ou SUG-1 est augmentée en présence de ligand**. De façon tout à fait intéressante, l'interaction avec SRC-3 est déplacée au profit de SUG-1 lorsque celui-ci est surexprimé et inversement. Ceci s'explique par le fait que les deux protéines interagissent avec le même domaine de RAR α mettant en jeu H12 (vom Baur et al., 1996). En effet, le mutant de RAR α délété de l'hélice H12, n'interagit plus ni avec SRC-3, ni avec SUG-1. Donc d'après nos résultats, un excès de SUG-1, entre en compétition avec SRC-3 empêchant l'interaction de ce dernier avec RAR α . Réciproquement, la surexpression de SRC-3 déplace l'excès de SUG-1, restaurant ainsi la transactivation des gènes cibles.

3. SRC-3 et SUG-1 sont recrutés sur les promoteurs des gènes Cyp26 et RAR β 2

J'ai ensuite cherché à déterminer si cette interaction entre les trois protéines avait un rôle fonctionnel et plus particulièrement transcriptionnel. Des expériences de ChIP, sur le promoteur des gènes Cyp26A1 et RAR β 2 (Figure 42) ont montré que **RAR α , SRC-3 et SUG-1 sont recrutés de manière simultanée et transitoire sur les différents RARE** avec un pic après une heure de traitement (Figures 44 et 47). Des expériences de re-ChIP où une première immunoprécipitation de RAR α a été suivie d'une immunoprécipitation de SUG-1 ont montré que lorsqu'il est recruté, SUG-1 fait partie du **même complexe que RAR α** au niveau des deux RARE du promoteur du gène Cyp26A1. D'autres expériences de re-ChIP ont montré que **SUG-1 est aussi associé à SRC-3**. Cependant, il reste à déterminer si les trois protéines font partie d'un même complexe ou non.

C. SRC-3 est dégradé de façon phospho-dépendante par le système UPS en réponse à l'AR

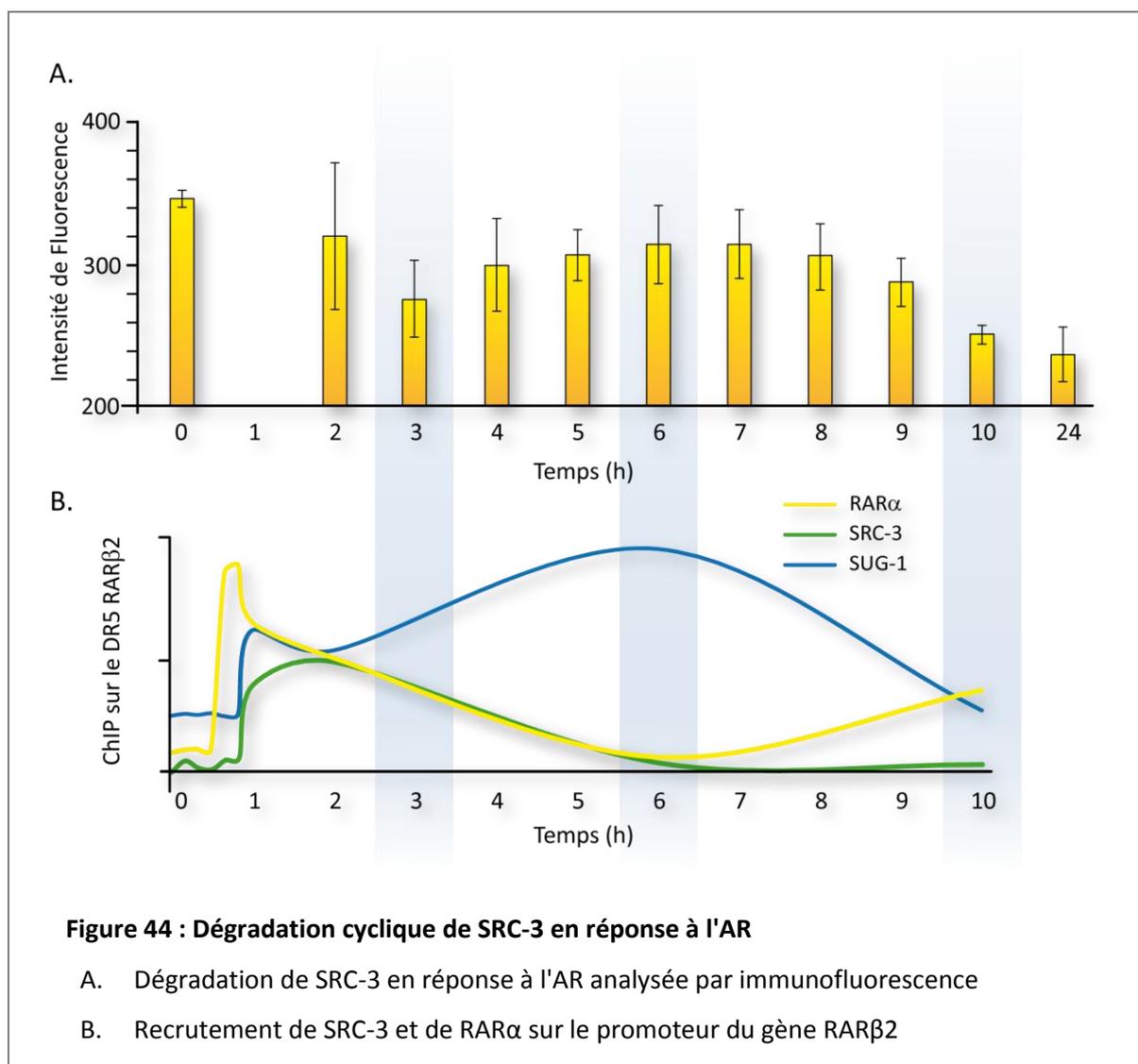
Suite à son intervention dans un cycle transcriptionnel, SRC-3 est dégradé (Publication 1). De plus, l'interaction entre RAR α et SRC-3 est augmentée en présence de MG-132, un inhibiteur du protéasome.

D'où l'hypothèse que *via* son activité protéolytique, le protéasome contrôlerait l'association/dissociation de SRC-3 ainsi que la dynamique de la transcription. Il était donc nécessaire de disséquer les mécanismes sous-jacents de cette dégradation et le rôle éventuel de SUG-1.

1. SRC-3 est dégradé par le protéasome en réponse à l'AR (Publications 1 et 3)

J'ai montré dans différentes lignées cellulaires, dans des contextes endogènes ou de surexpression que **SRC-3 est dégradé en réponse à l'AR**. En collaboration avec la plateforme de séquençage haut débit, j'ai mis au point les conditions d'analyse de la dégradation de SRC-3 par immunofluorescence. J'ai observé qu'en réponse à l'AR, SRC-3 est dégradé de **manière cyclique**, tout d'abord après 3h de traitement puis plus tardivement après 10h (figure 44). Ces résultats ont été confirmés par western blot.

Je me suis focalisée sur la dégradation précoce car elle est suivie du recrutement de SRC-3 sur les promoteurs des gènes cibles (Figure 44). Nous avons émis l'hypothèse que cette dégradation contrôlerait le recrutement cyclique du corégulateur au niveau de RAR α et des promoteurs. Par contre, la seconde dégradation interviendrait dans le signal d'arrêt des effets de l'AR.



J'ai ensuite montré par immunoblotting (Publication 1) et par immunofluorescence (Publication 3) que le protéasome participe à la dégradation de SRC-3. En effet, le coactivateur n'est plus dégradé en présence de MG-132 ou en présence de siRNA ciblant les sous-unités catalytiques du 20S CP, PSMB1 et PSMB2, confirmant **l'implication du protéasome** dans la dégradation de SRC-3.

2. SUG-1 interagit avec SRC-3 et participe à sa dégradation (Publications 1 et 3)

Etant donné que SUG-1, sous-unité du protéasome, est recruté avec SRC-3 au niveau des promoteurs des gènes cibles de RARα, nous avons émis l'hypothèse que SUG-1 participerait à la dégradation de SRC-3. Dans un premier temps, j'ai montré par des expériences d'immunoprécipitation que, *in vivo*, en conditions endogènes ou de surexpression, **SRC-3 et SUG-1 interagissent de façon ligand-dépendante** et que l'interaction entre les deux protéines est directe comme l'ont indiqué les expériences de GST-pull down (Publication 1).

Puis j'ai montré par western-blot (Publication 1) et par immunofluorescence (Publication 3) que la suppression de l'expression de SUG-1 suite à l'utilisation d'un siRNA spécifique, inhibe la dégradation de SRC-3. A l'inverse, la surexpression de SUG-1 augmente la dégradation de SRC-3 (Publication 1).

Ainsi, *in vivo via* SUG-1, le protéasome serait impliqué dans la dégradation de SRC-3 en réponse à l'AR. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées : soit SUG-1 participe à la reconnaissance du coactivateur par le protéasome soit il participe à la déstructuration de SRC-3 avant sa dégradation.

3. L'ubiquitination de SRC-3 fait intervenir un complexe Cul3-Rbx1 (Publication 3)

La dégradation des protéines étant précédée de leur ubiquitination, j'ai analysé 2h30 après l'addition d'AR et après immunoprécipitation de SRC-3, les formes ubiquitinées du coactivateur. Le **niveau d'ubiquitination de SRC-3 augmente en réponse à l'AR** et les formes ubiquitinées s'accumulent en présence de l'inhibiteur du protéasome MG-132. Donc l'AR induirait l'ubiquitination de SRC-3 pour l'entraîner vers la dégradation par le protéasome.

Comme nous l'avons abordé dans l'introduction, la reconnaissance des protéines cibles pour l'ubiquitination est réalisée par des E3 ubiquitine ligases. Nous avons alors cherché à déterminer quelle était la E3 impliquée dans l'ubiquitination de SRC-3. Afin de répondre à cette question, j'ai réalisé en collaboration avec la plateforme de séquençage haut débit, un criblage basé sur l'utilisation d'une banque de 110 siRNA ciblant des protéines impliquées dans des complexes E3 ubiquitine ligases après 3h de traitement d'AR. Nous avons identifié deux protéines, **Culline 3** et **Rbx1**, connues pour appartenir à un même complexe CRL (cf paragraphe IV.A.b.iii). En effet, les siRNA spécifiques de ces deux protéines inhibent la dégradation de SRC-3 et conduisent alors à une accumulation du coactivateur visualisée par immunofluorescence. A noter que les siRNA dirigés contre les E3 ligases E6-AP, Fbw7 et CHIP impliquées dans la dégradation de SRC-3 et de ER en réponse aux œstrogènes n'ont pas inhibé la dégradation de SRC-3 en réponse à l'AR. Ces résultats indiquent que la dégradation de SRC-3 en réponse à différents stimuli fait intervenir des mécanismes distincts et spécifiques.

Par des expériences de microscopie confocale, nous avons montré que SRC-3 est exclusivement nucléaire alors que Cul3 est localisée à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. De plus, des expériences de fractionnement cellulaire ont montré que **l'ubiquitination et la dégradation de SRC-3 ont lieu dans le noyau**. De façon tout à fait intéressante en réponse à l'AR, Cul3, se

relocalise dans le noyau et en périphérie de celui-ci. Cette **relocalisation de Cul3**, observée en réponse à l'AR, corrobore le rôle de cette culline dans l'ubiquitination de SRC-3. A l'inverse, la localisation des autres cullines, Cul1 et Cul2, n'est pas affectée, validant le rôle spécifique de Cul3 dans la réponse à l'AR.

4. Le complexe CRL3 participe à la transcription des gènes cibles de l'AR (Publication 3)

A l'image de l'implication de SUG-1 dans la transcription des gènes cibles de l'AR et dans la dégradation de SRC-3, nous avons étudié si le complexe CRL3 participait également à la transcription. J'ai analysé par qRT-PCR le niveau d'ARNm des gènes cibles Cyp26A1 et RAR β en présence d'un siRNA spécifique de Cul1, Cul2, Cul3 et Rbx1 ainsi que lors de la surexpression des trois cullines. Seuls les siRNA ciblant Cul3 et Rbx1 diminuent la transcription des gènes cibles en réponse à l'AR. Ces résultats appuient l'implication du complexe CRL3 dans la réponse à l'AR.

5. SRC-3 est phosphorylé en réponse à l'AR (Publication 3)

Dans le contexte des récepteurs des œstrogènes, la dégradation de SRC-3 est régulée, entre autres, par des processus de phosphorylation. J'ai donc étudié s'il pouvait en être de même dans le contexte des rétinoïdes.

Comme nous l'avons abordé dans l'introduction, SRC-3 renferme quatre sites consensus (S505, S543, S860 et S867) pour la p38MAPK (Figure 45). Des travaux réalisés dans l'équipe avaient montré que SRC-3 est phosphorylé en réponse à l'AR suite à l'activation de la p38MAPK (Gianni et al., 2006).

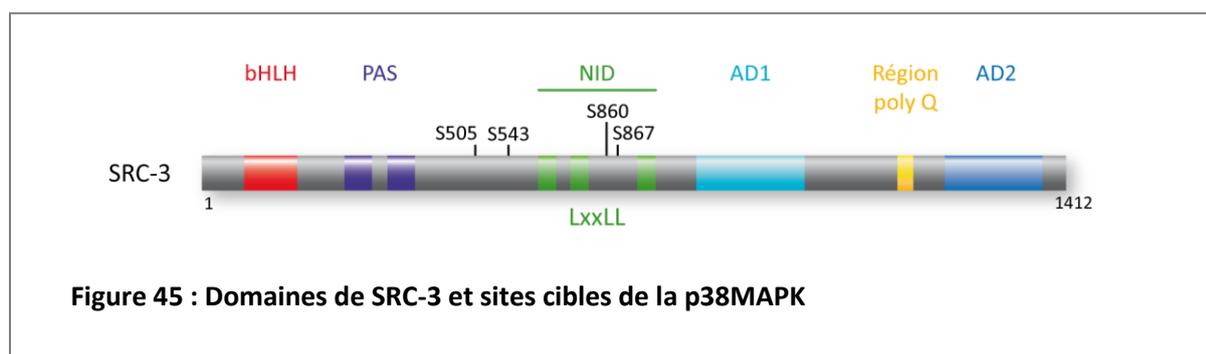
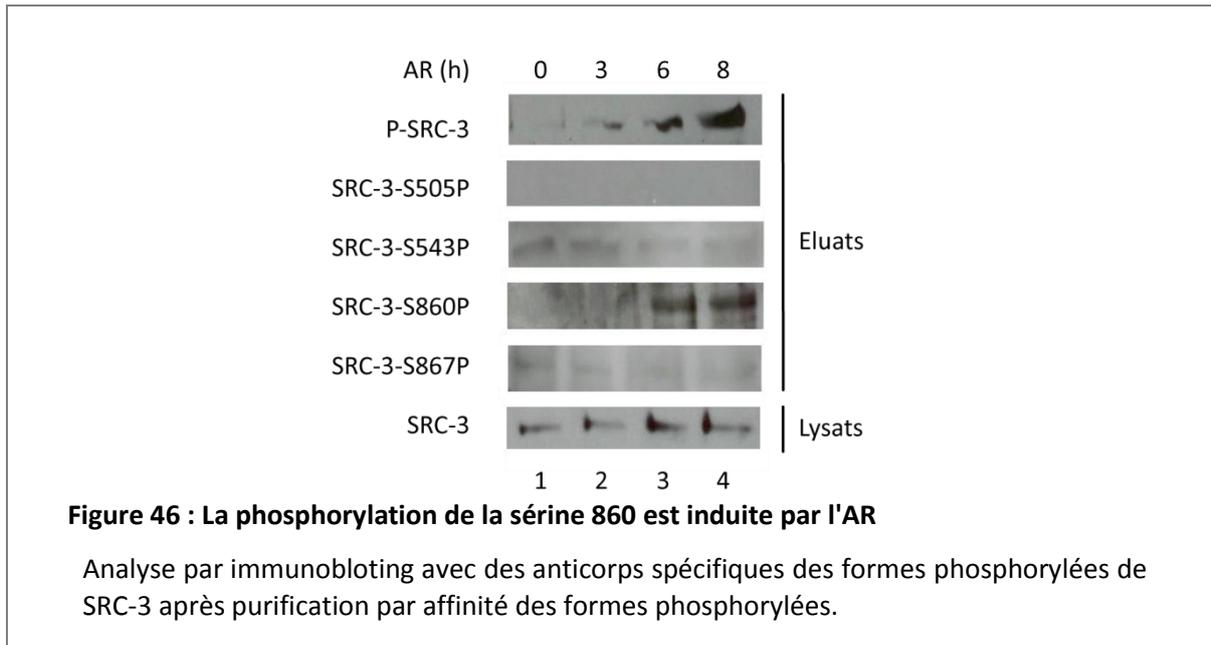


Figure 45 : Domaines de SRC-3 et sites cibles de la p38MAPK

J'ai alors généré des anticorps reconnaissant spécifiquement les quatre sites phosphorylés de SRC-3. Après purification des protéines phosphorylées par affinité, j'ai montré que l'AR augmente spécifiquement la **phosphorylation de la sérine 860** dans le cas de SRC-3 endogène comme dans celui de SRC-3 recombinant après surexpression (Figure 46).



6. Phospho-dépendance de l'ubiquitination et de la dégradation de SRC-3 (Publication 3)

Afin de tester l'implication de la phosphorylation de la sérine 860 dans la dégradation de SRC-3, un mutant avec cette sérine remplacée par une alanine (S860A) a été construit. Ce mutant n'est **plus dégradé** en réponse à l'AR, ce qui suggère le rôle clé de la phosphorylation de ce résidu. A noter que SRC-3 muté au niveau des autres sites de phosphorylation (S505A, S543A et S867A) se dégrade aussi efficacement que la protéine sauvage, confirmant l'importance de la sérine 860. Enfin, j'ai montré après immunoprécipitation spécifique de SRC-3 phosphorylé au niveau de la sérine 860 que cette forme augmente en réponse à l'AR, en même temps que son ubiquitination.

7. La dégradation nucléaire de SRC-3 n'a pas lieu au niveau de la chromatine

Au laboratoire, il avait été montré que la phosphorylation de SRC-3 diminuait l'interaction avec RAR α (Gianni et al., 2006). En présence d'AR, le pic de recrutement de SRC-3 sur le promoteur des gènes cibles précède sa phosphorylation ainsi que sa dégradation. D'où l'hypothèse que la phosphorylation de la sérine 860 serait le signal pour d'une part sa dissociation du complexe fixé aux RARE et d'autre part pour le recrutement du complexe CRL3, en dehors de l'ADN.

Par des expériences de fractionnement cellulaire suivies d'immunoblotting ou d'immunoprécipitations spécifiques de SRC-3 phosphorylé au niveau de la sérine 860, j'ai montré que la fraction de SRC-3 associée à la chromatine était plus faible que la fraction nucléaire soluble. De

plus, lorsque SRC-3 est associé à la chromatine, il n'est ni ubiquitiné, ni dégradé en réponse à l'AR. A l'inverse, la fraction majoritaire de coactivateur présente dans la fraction nucléaire soluble est phosphorylée, ubiquitinée et dégradée en réponse à l'AR. En outre, Cul3 et Rbx1 sont présents dans la fraction nucléaire soluble et non dans la fraction chromatinienne.

8. Conclusion

J'ai montré qu'en réponse à l'AR, RAR α est recruté avec SRC-3 et SUG-1 au niveau des promoteurs des gènes cibles. Ces deux corégulateurs participent à la transcription de ces gènes cibles. Ensuite, SRC-3 est phosphorylé sur la sérine 860. Cette modification semble être le signal de dissociation du récepteur fixé au RARE ainsi que le signal de reconnaissance du coactivateur par un complexe CRL3 entraînant son ubiquitination. Une fois ubiquitiné, SRC-3 est dégradé par le protéasome dans le noyau des cellules (Figure 47).

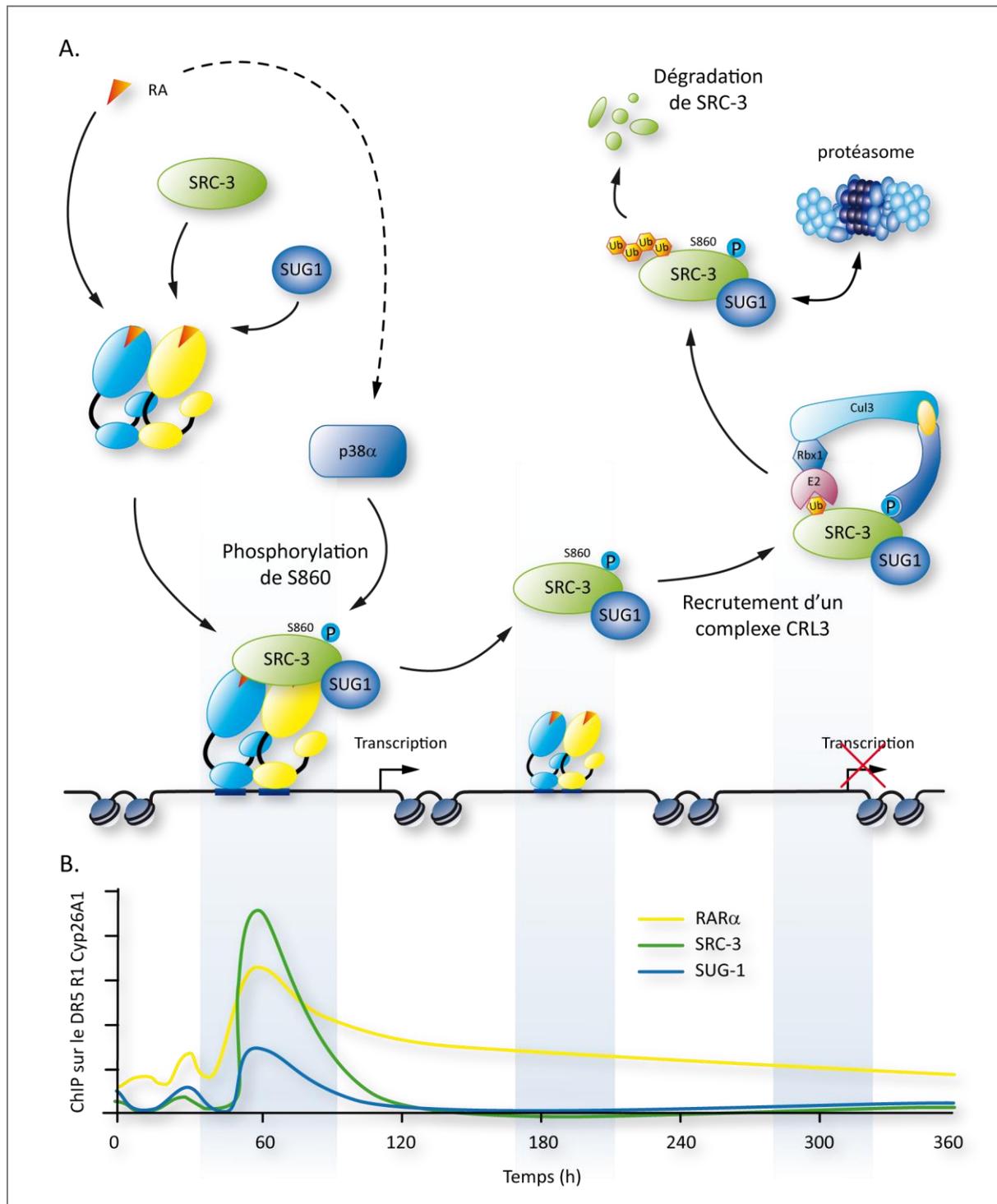


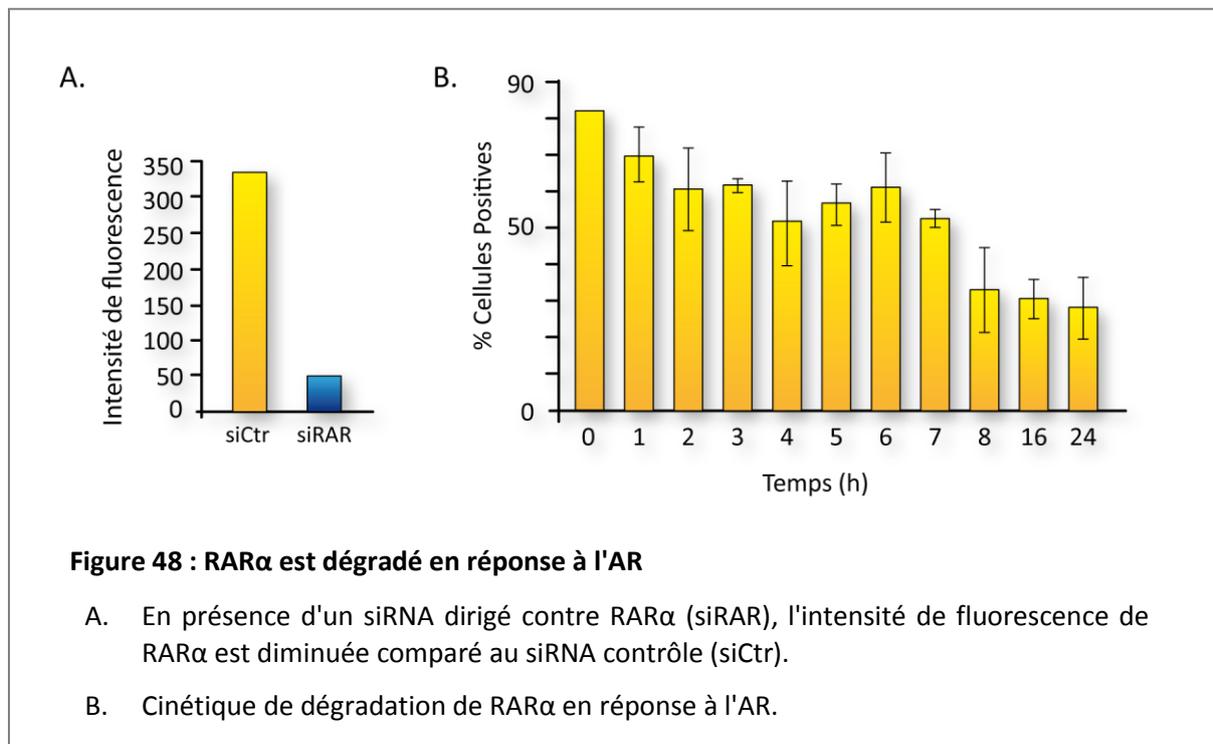
Figure 47 : Modèle d'activation et de dégradation de SRC-3 dans la réponse à l'AR

- A. En réponse à l'AR, SRC-3 est recruté avec RARα et SUG-1 sur le promoteur des gènes cibles de l'AR. Puis après sa phosphorylation sur la sérine 860, il se dissocie du complexe lié à l'ADN. Un complexe CRL3 induit l'ubiquitination du coactivateur ce qui l'entraîne vers sa dégradation par le protéasome.
- B. SRC-3, RARα et SUG-1 sont recrutés sur le RARE proximal du gène Cyp26A1.

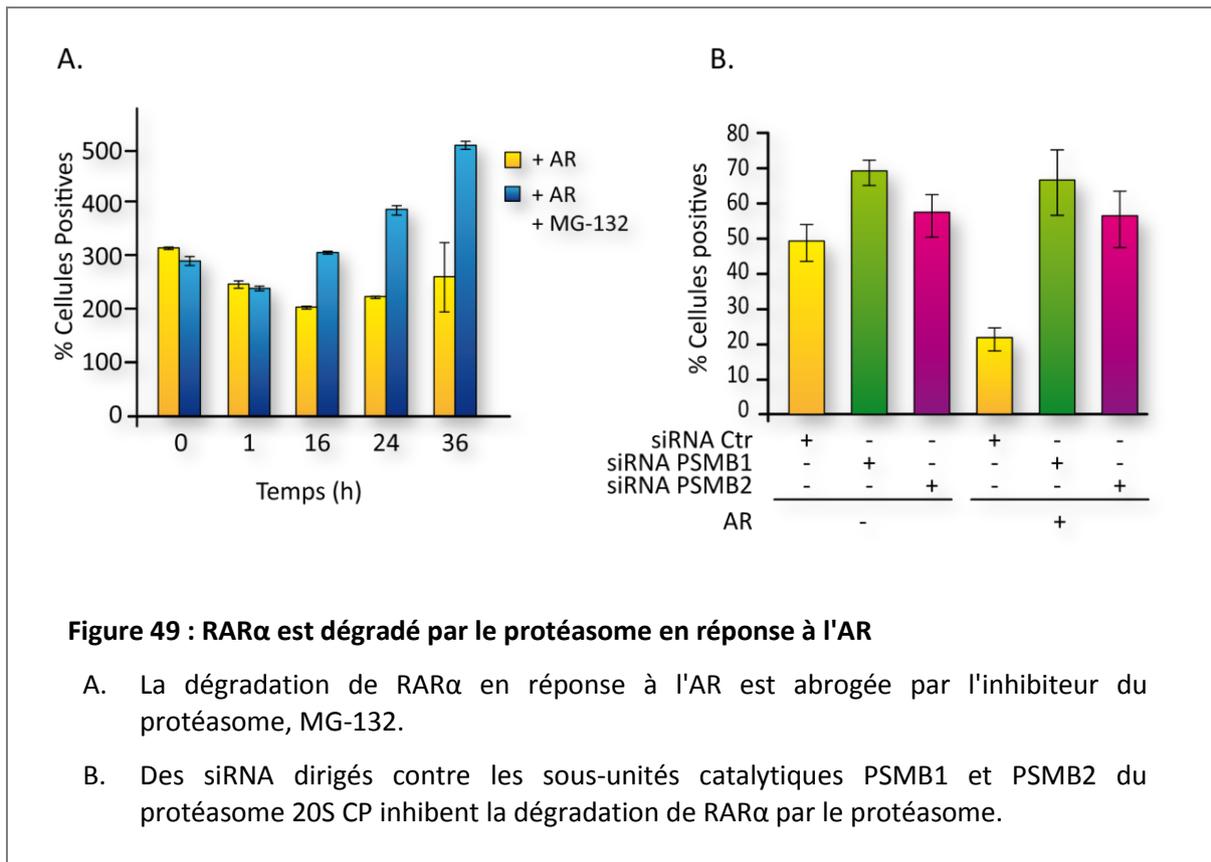
II. Dégradation de RAR α : un cas à part? (Résultats non publiés)

A. RAR α est dégradé par le protéasome indépendamment de SRC-3 et de SUG-1

Dans diverses lignées cellulaires (COS, MEF et MCF7), dans des contextes endogènes ou de surexpression, RAR α est dégradé en réponse à l'AR (Publication 1). J'ai affiné la cinétique de dégradation dans les cellules MCF7 en collaboration avec la plateforme de séquençage haut débit. Dans un premier temps, j'ai validé la technique *via* l'utilisation d'un siRNA dirigé contre RAR α : une diminution du signal est observée et est quantifiable (Figure 48a). Puis dans un second temps, j'ai montré par immunofluorescence que **RAR α est dégradé à partir de 8h** de traitement (Figure 48b) lorsque le processus transcriptionnel est terminé (Publication 2).



La dégradation de RAR α fait intervenir le protéasome. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome (MG-132) (Figure 49a) ou de siRNA ciblant les sous-unités catalytiques du protéasome, PSMB1 et PSMB2 (Figure 49b), inhibe la dégradation de RAR α . Cependant, à la différence de SRC-3, SUG-1 ne participe pas à la dégradation de RAR α . En effet, de façon surprenante, l'utilisation de siRNA spécifiques de SUG-1 ne supprime pas la dégradation du récepteur mais l'augmente (Publication 1).



Comme SRC-3 contrôle la dégradation du récepteur des œstrogènes en servant de plateforme pour le recrutement de la E3 ubiquitine ligase E6-AP (Shao et al., 2004), nous avons analysé s'il en était de même pour RAR α . En fait, ce modèle n'est pas transposable à RAR α car la suppression de SRC-3 avec des siRNA n'affecte pas la dégradation du récepteur (Publication 1).

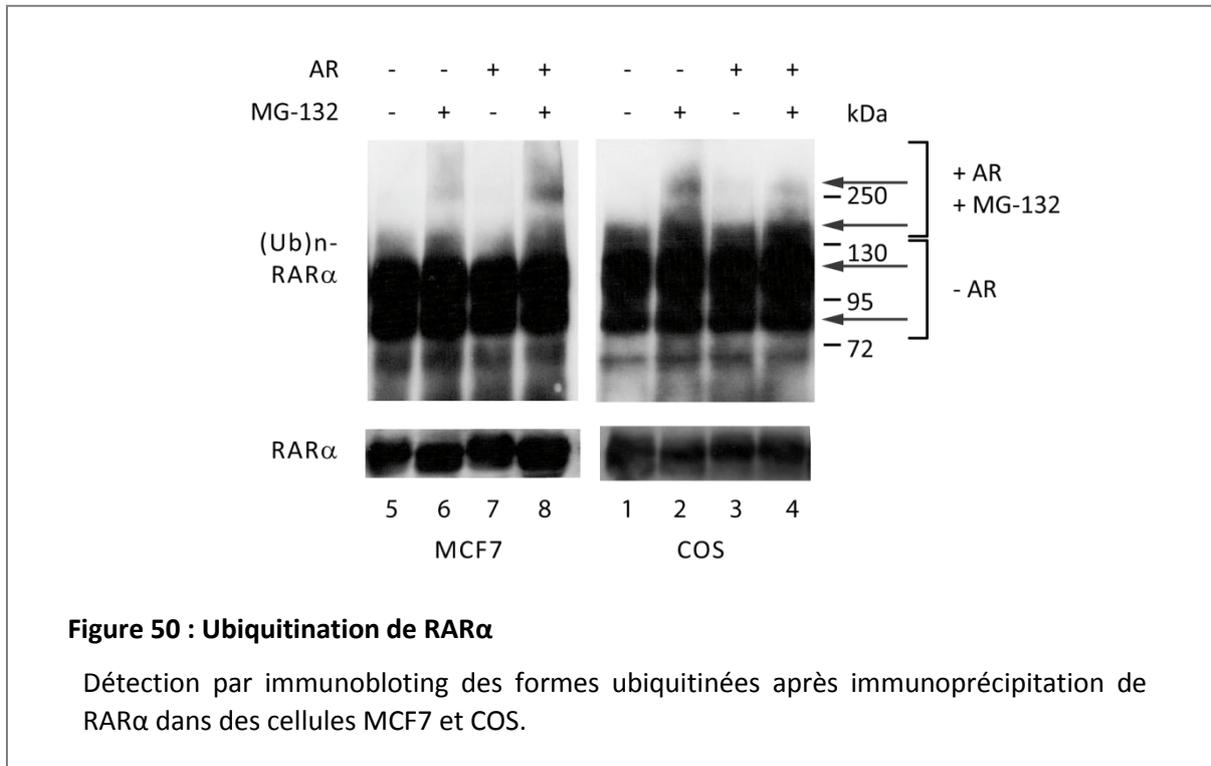
B. La dégradation de RAR α ne fait pas intervenir les acteurs classiques

1. RAR α : une protéine, deux types d'ubiquitination

Une fois l'implication du protéasome mise en évidence dans la dégradation de RAR α , nous avons cherché à déterminer si le récepteur était ubiquitiné et si l'AR induisait des variations de cette modification. Nous avons utilisé la même stratégie que celle développée pour l'étude de la dégradation de SRC-3.

Ainsi, dans des contextes endogènes (MCF7 et MEF) ou de surexpression de RAR α et de l'ubiquitine couplée à une étiquette HA dans les cellules COS, j'ai montré que RAR α présente deux types d'ubiquitination : d'une part, une **ubiquitination de base** qui ne varie pas en présence d'AR ou de MG-132 et d'autre part une **ubiquitination induite par l'AR**. De manière intéressante, cette

dernière forme ubiquitinée AR-dépendante s'accumule en présence de MG-132 (Figure 50). Deux formes ubiquitinées basales ont été détectées par immunoblotting avec des poids moléculaires de l'ordre de 75-80 kDa et de 100-110 kDa. Ces formes ne varient pas en intensité suite à l'addition d'AR ou d'inhibiteur du protéasome. Cependant, en présence de MG-132 et d'AR, nous avons mis en évidence l'apparition de bandes de plus hauts poids moléculaires (150 à 250 kDa).



2. E3 impliquée dans l'ubiquitination de RAR α : un cas à part

Notre but était alors d'identifier la E3 ubiquitine ligase impliquée dans l'ubiquitination de RAR α induite par l'AR. Comme précédemment, j'ai réalisé un criblage avec la même banque de siRNA que dans le cas de SRC-3. Malheureusement, les résultats obtenus ne nous ont pas permis de mettre en évidence un complexe E3 impliqué dans la dégradation du récepteur observée, 8h après l'addition d'AR. D'où l'hypothèse que l'ubiquitination de RAR α et donc sa dégradation ne feraient pas intervenir des acteurs et des mécanismes classiques.

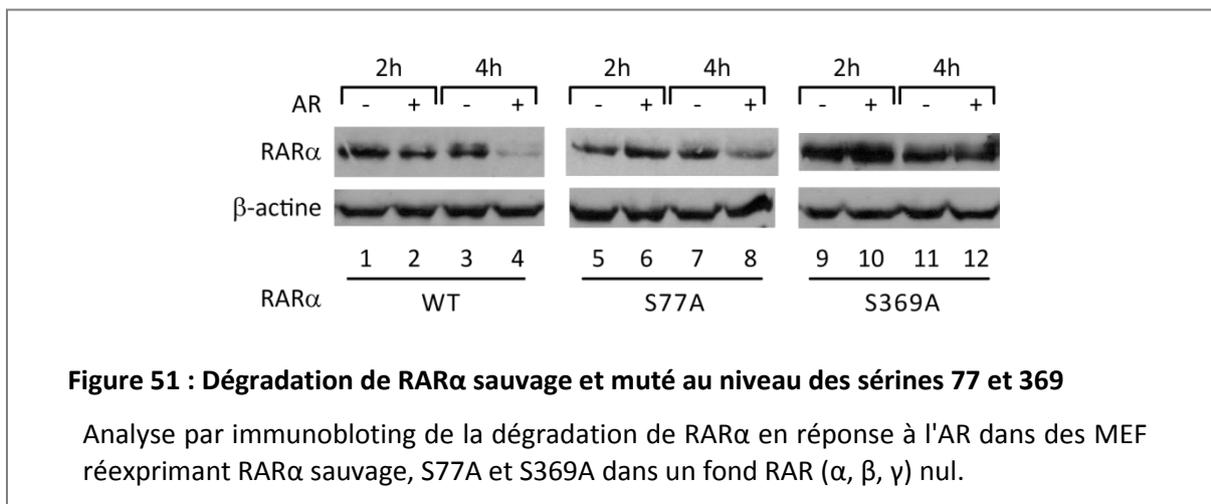
J'ai alors commencé à développer la technique de spectrométrie de masse afin d'isoler des complexes associés à RAR α dans le but d'identifier les éventuelles E3 impliquées dans son ubiquitination. Les conditions sont encore en cours de mise au point.

C. Dégradation de RAR α : "sous produit" de la transcription?

Selon les hypothèses du laboratoire, la dégradation de RAR α (8h après l'addition d'AR) suivrait l'implication du récepteur dans des cycles transcriptionnels (qui débutent dès 1h). Etant donné que l'activité transcriptionnelle de RAR α dépend de son état de phosphorylation et du recrutement de corégulateurs au niveau du domaine AF-2, nous nous sommes alors penchés sur le rôle éventuel de la phosphorylation des sérines 77 et 369 et/ou de l'hélice H12 dans la régulation de la dégradation du récepteur en réponse à l'AR.

1. Rôle de la phosphorylation des sérines 77 et 369 ?

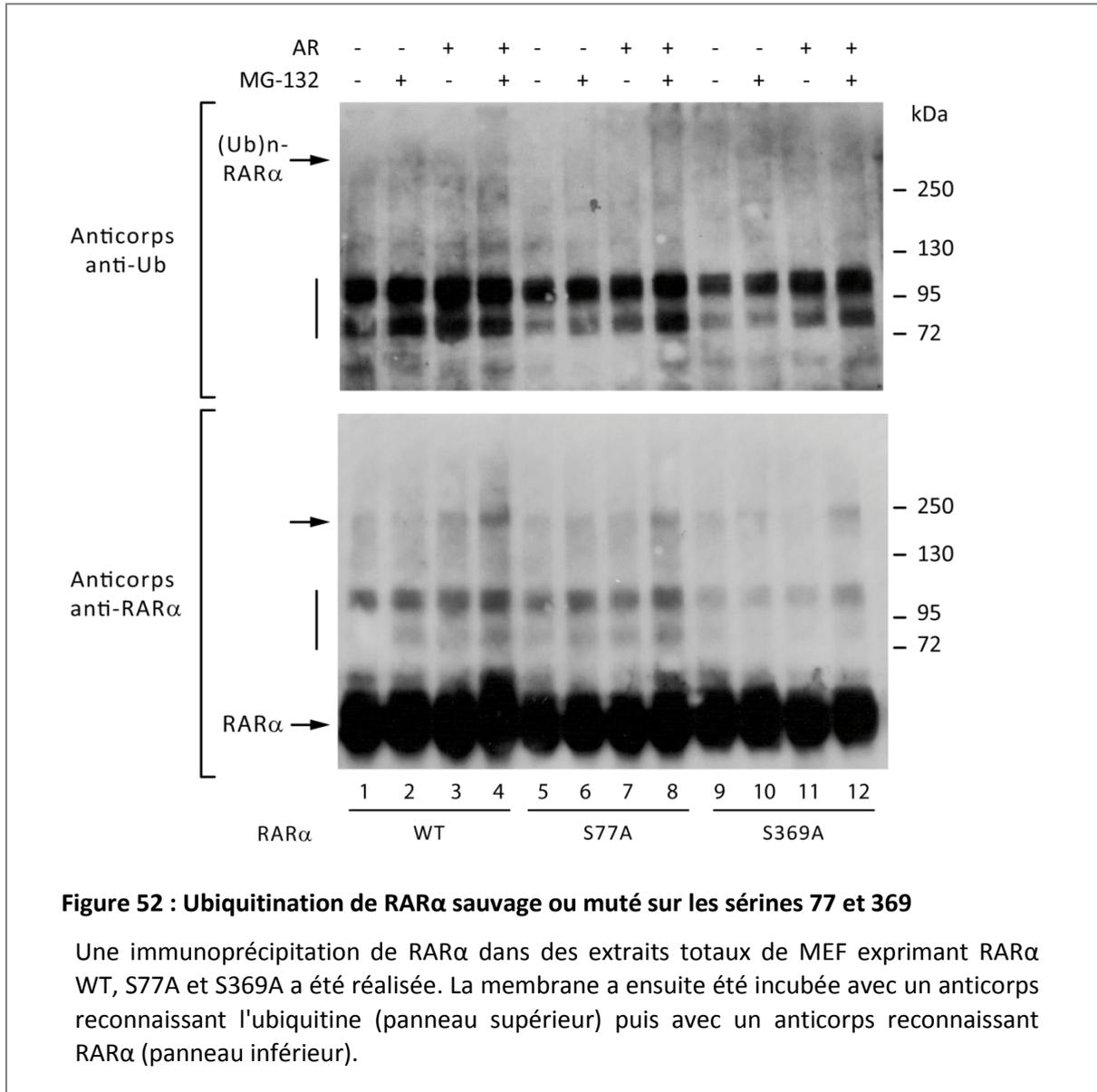
J'ai analysé la dégradation de RAR α sauvage, S77A et S369A dans des cellules MEF qui réexpriment ces récepteurs dans un fond RAR (α , β , γ) nul (Figure 51). J'ai observé par immunoblotting que le mutant S77A est moins efficacement dégradé que le récepteur sauvage (WT). Par contre, le mutant S369A n'est plus dégradé en réponse à l'AR. La phosphorylation de la sérine 369 semble donc jouer un rôle dans la dégradation de RAR α .



Ces défauts de dégradation pouvant refléter des anomalies d'ubiquitination, j'ai analysé après immunoprécipitation de RAR α (sauvage ou muté au niveau des sites de phosphorylation), l'ubiquitination du récepteur (Figure 52). De façon surprenante, l'ubiquitination basale de RAR α est affectée par la mutation des sérines 77 et 369. En effet, les formes ubiquitinées de 75-80 kDa sont moins intenses dans le cas des deux mutants. Cependant, ces formes sont restaurées suite au traitement des cellules par l'AR et MG-132. Par contre, la seule mutation S369A semble supprimer l'apparition des formes de hauts poids moléculaires induits par l'AR et le MG-132.

En conclusion, il semble que l'état de phosphorylation de RAR α module son ubiquitination/dégradation. Cependant, il reste à déterminer le mécanisme de cet effet. Est-il lié à l'activité

transcriptionnelle de RAR α et/ou à une dynamique de recrutement du système UPS comme dans le cas de la cycline H?



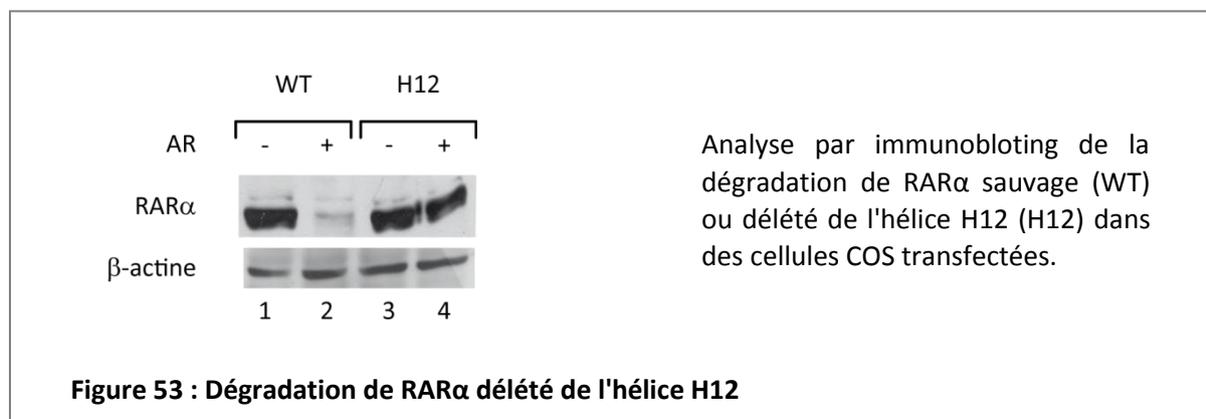
Enfin, étant donné que les RAR sont des cibles pour de nombreuses modifications post-traductionnelles, il n'est pas exclu qu'une autre modification phospho-dépendante et/ou une SUMOylation soient également impliquées. Des expériences de SUMOylation de RAR α ont été entreprises mais d'après les résultats préliminaires, RAR α ne serait pas SUMOylé en réponse à l'AR.

2. L'hélice H12 : sur la bonne piste?

A l'image des deux sérines 77 et 369 dans la transcription des gènes cibles, l'hélice H12 joue également un rôle clé puisqu'elle participe au recrutement des corégulateurs (cf paragraphe I.B.1.b.iii). J'ai montré qu'un mutant de RAR α délété de cette hélice H12 n'est plus dégradé en

réponse à l'AR (Figure 53). Il serait alors intéressant d'étudier si cette absence de dégradation résulte d'un défaut d'ubiquitination ou de recrutement du protéasome.

Néanmoins nous pouvons émettre l'hypothèse que le recrutement de la E3 ubiquitine ligase ou de la machinerie de dégradation s'effectue *via* H12.



D. PTM, dégradation... mais encore?

J'ai montré que RAR α est ubiquitiné puis dégradé par le protéasome en réponse à l'AR. L'ubiquitination induite par l'AR s'ajoute à une ubiquitination basale. J'ai également montré que la phosphorylation de RAR α contrôle son ubiquitination et sa dégradation. Cependant, ces processus ne semblent pas faire intervenir les acteurs et les mécanismes classiques. Il reste à démontrer comment la phosphorylation/l'ubiquitination et le protéasome coopèrent pour contrôler l'activité transcriptionnelle et la dégradation de RAR α .

Discussion

Les résultats de mes travaux ont permis de montrer que la **transcription** des gènes cibles de RAR α et la **dégradation** du récepteur et de son coactivateur SRC-3 sont intimement liées. De plus, j'ai montré que ces deux processus cellulaires font intervenir le **protéasome** 26S et/ou ses sous-complexes et sont régulés par des phénomènes de **phosphorylation**.

Ces résultats soulèvent cependant encore de multiples questions dont certaines sont en cours d'investigation au laboratoire.

I. Phosphorylation : régulation "ultrafine" de la réponse à l'AR

Les phosphorylations sont des modifications rapides et réversibles. La fixation covalente d'un groupement phosphate au niveau d'une sérine, d'une tyrosine ou d'une thréonine ajoute non seulement une nouvelle charge négative au substrat mais aussi de nouvelles contraintes stériques dues à la taille du groupement. Ainsi de façon générale, la phosphorylation peut modifier **la structure** (cf paragraphe I.B.1.c), **l'activité** (cf chapitre II) et la **localisation** des substrats (cf paragraphe III.B.1.a) (Publication 4) *via* des **changements conformationnels** de la région phosphorylée ou de domaines adjacents (Gardner and Montminy, 2005; Pufall et al., 2005), *via* la rigidification locale de la structure (communication personnelle) ou encore *via* la modulation **d'interactions protéine-protéine**.

A. Phosphorylation et interaction de RAR α avec ses partenaires

La phosphorylation module des interactions soit directement en contrôlant l'association-dissociation d'interactants reconnaissant spécifiquement les groupements phosphates soit indirectement *via* des changements conformationnels affectant des domaines adjacents. Ainsi dans le cas de RXR α , la phosphorylation de la boucle Ω entre les hélices H1 et H3 du LBD altère la structure de la région voisine impliquée dans l'interaction avec les coactivateurs qui ne sont alors plus recrutés (Macoritto et al., 2008). A l'inverse, dans le cas de RAR α , nous avons montré que la phosphorylation de la sérine 369 située dans la boucle L9-10 augmente l'interaction avec la cycline H au niveau de la boucle L8-9 (Publication 2) (Bour et al., 2005a; Gaillard et al., 2006). Cette phosphorylation serait le signal de recrutement du complexe cych/cdk7, entraînant la phosphorylation par cdk7 du NTD de RAR α au niveau de la sérine 77 (Gaillard et al., 2006). Cette dernière phosphorylation permet le recrutement de l'hétérodimère RAR α /RXR à l'ADN (Publication 2), très probablement *via* la propagation de changements structuraux vers le DBD. Etant donné que d'après nos données de CHIP, seulement une fraction du "pool" de RAR α est recrutée à l'ADN en réponse au ligand, nous pouvons

proposer que la phosphorylation de RAR α constituerait une régulation fine et ordonnée de la transcription des gènes cibles, en aiguillant une fraction des récepteurs vers l'ADN.

B. Phosphorylation et ubiquitination/dégradation de SRC-3

Pour un nombre croissant de protéines, il a été montré que leur état de phosphorylation est lié à leur dégradation par le protéasome. En effet, en **régulant l'interaction de complexes E3 ubiquitine ligases**, la phosphorylation/déphosphorylation d'un substrat peut constituer le signal d'ubiquitination. Un exemple de ce modèle est la dégradation phospho-dépendante de TAL1 (T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia 1). En effet, en réponse au facteur de croissance TGF- β (Transforming Growth Factor β), TAL1 est phosphorylé par Akt, ce qui induit le recrutement de la E3 CHIP, l'ubiquitination puis la dégradation de TAL1 (Terme et al., 2009).

Il a également été montré que les **séquences PEST** qui comme leur nom l'indique, renferment de nombreux acides aminés prolines (P), acides glutamiques (E), sérines (S) et thréonines (T) participent à la **stabilité** et à la **demi-vie** des protéines (Rechsteiner and Rogers, 1996; Rogers et al., 1986) *via* notamment le recrutement du système UPS (Marchal et al., 1998). Les sérines et thréonines des séquences PEST ou des régions adjacentes, peuvent être phosphorylées, ce qui ajoute un niveau de régulation supplémentaire à la dégradation du substrat. Ainsi dans certains cas, la mutation en alanine des acides aminés phosphorylables de cette séquence entraîne la perte de la dégradation alors que la mutation en acide glutamique, mimant la charge négative du groupement phosphate, la rétablit (Marchal et al., 1998). Cependant, ce n'est pas une règle absolue. En effet, dans le cas de LYL1 (Lymphoblastic Leukemia 1), la phosphorylation par une MAPK d'une sérine appartenant à la séquence PEST ne modifie ni la demi-vie de la protéine, ni son ubiquitination (Lukov and Goodell, 2010).

Nous avons montré qu'en réponse à l'AR, SRC-3 est recruté avec RAR α au niveau des promoteurs des gènes cibles où il est ensuite phosphorylé au niveau de la sérine 860. Ce résidu est localisé au sein du **NID** (Figure 54), entre les deux derniers motifs LxxLL impliqués dans l'interaction avec RAR α . La phosphorylation de cette sérine 860 jouerait un rôle double. Dans un premier temps, elle serait le **signal de dissociation avec RAR α** à l'image de la dissociation de la vinexine β avec RAR γ lorsque ce dernier est phosphorylé (Lalevee et al., 2010), très probablement *via* des changements allostériques se propageant aux motifs LxxLL. Puis dans un deuxième temps, la phosphorylation de la sérine 860 permet l'ubiquitination de SRC-3 en dehors de la chromatine probablement en modulant son interaction avec le complexe CRL3. *In fine*, ce processus aboutirait au recrutement du protéasome secondé par SUG-1.



De façon surprenante, en présence d'AR, Cul3 se relocalise dans le noyau et à sa périphérie. Cependant, aucune séquence NLS n'a été trouvée *in silico* au sein de Cul3

(<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>). Néanmoins, il est possible d'imaginer qu'en réponse à l'AR, Cul3 serait prise en charge par une protéine de type Importine (Fried and Kutay, 2003) qui l'importerait dans le noyau pour y ubiquitiner SRC-3.

La reconnaissance des substrats par des complexes CRL3 est assurée par des protéines adaptatrices de type BTB (cf paragraphe IV.1.a.iii). Cependant, nous n'avons pas intégré de siRNA ciblant cette famille de protéines lors de notre criblage. Il serait alors intéressant de réaliser un nouveau criblage avec une banque de siRNA spécifiques des 190 protéines BTB connues (Stogios et al., 2005) afin d'identifier la protéine impliquée dans la reconnaissance de SRC-3. Néanmoins, Xing et al., ont récemment montré que, dans le cas de HSF2 (Heat Shock Factor protein 2), **Cul3 peut interagir directement avec une séquence PEST** et entraîner son ubiquitination puis sa dégradation (Xing et al., 2010). A noter que SRC-3 renferme une séquence PEST entre les résidus 647 et 674 (Figure 54) (Yan et al., 2003) et que la serine 860 appartient à une séquence PEST potentielle (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>) bien que présentant un score faible.

Suite à ces résultats, il serait intéressant de déterminer (1) si l'interaction entre le coactivateur et cul3 est directe et si elle dépend de la phosphorylation de la serine 860, (2) si la phosphorylation de cette sérine a lieu lorsque le coactivateur est associé à RAR α sur le promoteur des gènes cibles puis (3) de valider que le complexe CRL3 n'est pas recruté par SRC-3 sur l'ADN.

II. Le protéasome : régulation fine de la réponse à l'AR

A. Régulation de la transcription des gènes cibles de l'AR en absence de protéolyse

1. Recrutement du protéasome *via* RAR α et/ou ses corégulateurs

Nos résultats ont mis en évidence l'implication de SUG-1 dans la transcription des gènes cibles de l'AR *via* son association avec RAR α et/ou SRC-3. Ces données sont en accord avec d'autres travaux et convergent vers un **rôle non protéolytique de SUG-1 dans la transcription**. En effet, SUG-1 a la capacité d'interagir avec le domaine AF-2 de RN dont RAR, TR et ER (vom Baur et al., 1996) ainsi qu'avec la sous unité TAF_{II}90 de TFIID et TBP (Sun and Allis, 2002; Yanagi et al., 2000), la sous-unité XPB de TFIIH (Xeroderma Pigmentosum group B-complementing protein) et Tfb2 (RNA polymérase II Transcription factor B subunit 2) (Sun et al., 2002; Weeda et al., 1997). D'après des travaux récents de Bhat *et al.*, **SUG-1 participerait *via* son activité ATPasique à l'assemblage et à la stabilisation de complexes multiprotéiques au niveau des promoteurs** (Bhat et al., 2008). SUG-1 pourrait également jouer un rôle similaire dans le contexte de RAR α . Cette hypothèse pourrait être validée par qRT-PCR grâce à l'utilisation d'un mutant de SUG-1 dont le site catalytique AAA-ATPasique n'est plus actif.

2. Rôles non protéolytiques du protéasome indépendants de RAR α

SUG-1 participe également à la transcription des gènes cibles de l'AR, mais indépendamment de RAR α , au sein d'un complexe APIS, *via* son activité **hélicase** dans le remodelage local de la chromatine (Fraser et al., 1997). SUG-1 et plus généralement le 19S RP, participe aussi aux **modifications des histones** dans le contexte de l'interdépendance entre les marques épigénétiques comme l'ubiquitination des histones H2B et la méthylation des histones H3 (Ezhkova and Tansey, 2004; Lee et al., 2005). Ceci serait en accord avec nos résultats de CHIP où l'on observe un recrutement SUG-1 après le départ de RAR α et de SRC-3 du promoteur de RAR β 2. Ce rôle de SUG-1 semble cependant être promoteur spécifique car son recrutement tardif n'est pas observé au niveau des RARE du gène Cyp26A1. Il serait alors intéressant de corrélérer le recrutement de SUG-1 à l'état de phosphorylation, d'acétylation, d'ubiquitination, etc. des histones.

Finalement, de nombreux travaux ont mis en lumière le rôle de SUG-1 dans l'**élongation** au sein d'un complexe avec l'ARNpolIII (Ferdous et al., 2001; Ferdous et al., 2002; Gonzalez et al., 2002; Rubin et al., 1996). Des expériences de CHIP et de re-CHIP de l'ARNpolIII et de SUG-1 au niveau des

gènes cibles de l'AR permettraient d'établir le rôle de SUG-1 dans l'élongation de la transcription dans le contexte de l'AR.

B. Protéasome et recrutement cyclique de SRC-3 sur le promoteur des gènes cibles de l'AR

Des travaux dans le contexte de ER avaient mis en évidence un recrutement cyclique des différents acteurs de la transcription en réponse aux œstrogènes (Metivier et al., 2003). D'autres travaux ont montré que l'activité protéolytique du protéasome 26S est requise pour le contrôle de la transcription (Kinyamu et al., 2005; Lipford and Deshaies, 2003) et plus particulièrement pour la dynamique des échanges des différents corégulateurs (Hager et al., 2009; Perissi and Rosenfeld, 2005). Ainsi, en présence d'inhibiteur du protéasome, la transcription de la plupart des RN est diminuée (Dennis et al., 2005; Gianni et al., 2002a; Kang et al., 2002; Lonard et al., 2000).

Nous avons également observé un **recrutement cyclique de SRC-3 au niveau des promoteurs des gènes cibles de l'AR durant la première heure après l'addition d'AR**. Le système UPS et plus particulièrement SUG-1 et un complexe CRL3, pourraient être impliqués dans ce mécanisme puisque la perte de ces deux protéines, qui participent à la dégradation AR-dépendante de SRC-3, entraîne une inhibition de la transcription des gènes cibles. Il serait intéressant de tester si un siRNA dirigé contre SUG-1 et Cul3/Rbx1 fige le système en bloquant le départ de SRC-3 des promoteurs. De même, la surexpression du mutant S860A de SRC-3 qui n'est plus dégradé en réponse à l'AR, devrait figer le système.

C. Conclusion : le système UPS joue un rôle global dans la réponse à l'AR

L'ensemble de ces données tend à montrer que **SUG-1** joue un **rôle global et essentiel** dans la réponse à l'AR. En effet, il intervient pratiquement à tous les niveaux : de la préparation de la chromatine à la dégradation de SRC-3 en passant par l'initiation de la transcription et l'élongation. Ceci pourrait expliquer pourquoi son niveau d'expression qui semble être un élément très important pour l'équilibre de tous les mécanismes transcriptionnels, ne varie pas en réponse à l'AR. Il serait intéressant d'étudier si d'autres sous-unités du protéasome et particulièrement d'autres sous-unités du 19S RP participent également à la réponse à l'AR. La même stratégie que celle développée pour l'étude du rôle de SUG-1 pourrait être mise en place.

III. Le protéasome et la dégradation massive et tardive de RAR α : régulation grossière de la fin du signal AR

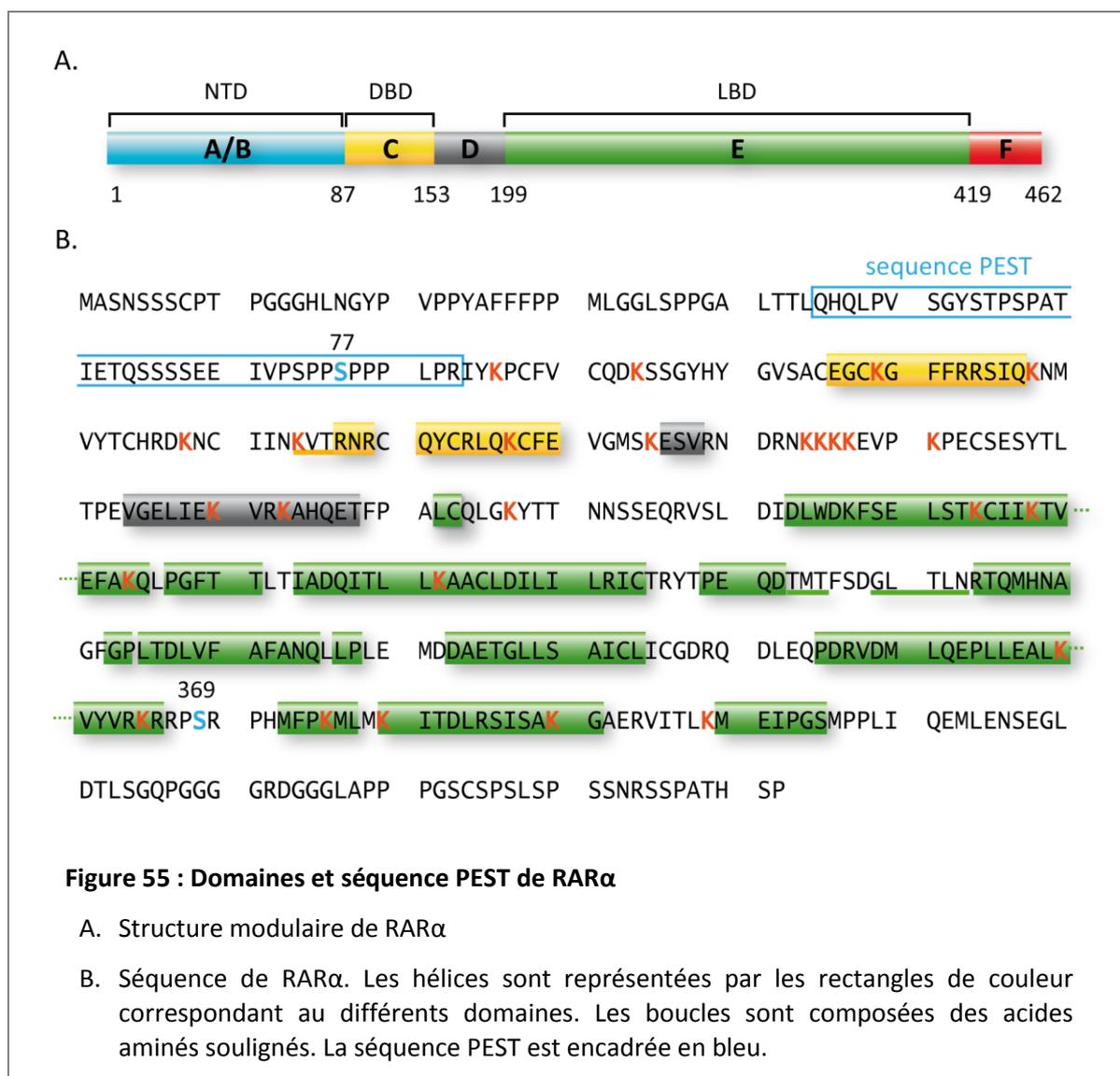
Le ligand induit non seulement la transcription des gènes cibles de la plupart des RN (RAR, TR, ER, VDR, PR et GR) mais aussi la dégradation de ces derniers par le protéasome (Chen et al., 2006; Dennis and O'Malley, 2005). Le lien étroit entre la transcription et la dégradation est un concept général aux RN et constitue un signal grossier d'arrêt de la réponse. Ainsi, la **dégradation de RAR α** (8h après l'addition d'AR) comme la deuxième **dégradation tardive de SRC-3** constitueraient donc le **signal de fin du système**. Dans le cas de SRC-3, il reste à déterminer si cette seconde dégradation fait intervenir ou non la phosphorylation de la sérine 860 et le recrutement d'un complexe CRL3. En tout cas, des régulations supplémentaires doivent s'ajouter sinon tout le "pool" de SRC-3 serait dégradé 3h après l'addition d'AR, dès le premier cycle de dégradation.

A. Dégradation atypique de RAR α

D'après nos résultats, la dégradation de RAR α semble s'écarter des sentiers battus et des modèles proposés pour les autres récepteurs nucléaires et ne ferait pas intervenir des E3 classiques comme en témoignent les résultats du criblage. De plus, deux types d'ubiquitination, de base ou induite par l'AR, cohabitent au sein de RAR α et feraient donc intervenir des E2 et des E3 différentes. En effet, l'ubiquitination basale n'intervient pas dans la dégradation du récepteur et pourrait servir de plateforme pour le recrutement de protéines renfermant des domaines UBD. Il serait alors judicieux de déterminer (1) quelle(s) lysine(s) est(sont) modifiée(s) par spectrométrie de masse et (2) quel le type de ramification est présent au sein des chaînes d'ubiquitines. A l'inverse, l'ubiquitination induite par l'AR semble être celle qui entraîne la dégradation du récepteur.

B. Quel est le signal de la dégradation de RAR α ?

Comme abordé précédemment, la phosphorylation du substrat est souvent le signal entraînant son ubiquitination puis sa dégradation. Dans le cas de RAR α , la mutation de la sérine 77, qui inhibe la fixation de RAR α au RARE et donc la transcription, n'affecte pas la dégradation du récepteur en réponse au ligand, bien que cette sérine appartienne à la séquence PEST de RAR α (Figure 55) (Kopf et al., 2000). Par contre de façon surprenante, en absence de ligand, lorsque la sérine S77 est phosphorylée, RAR α est dégradé par le protéasome suite à la fixation de Pin1 (Brondani et al., 2005). D'où l'hypothèse qu'en absence de ligand, Pin 1 et le protéasome agiraient comme un système de contrôle pour éliminer les formes phosphorylées en absence de fixation du ligand et donc non fonctionnelles de RAR α .



En fait, d'après nos résultats, seule la mutation de la sérine 369 ainsi que la délétion de l'hélice H12 conduisent à une inhibition de la dégradation du récepteur. Au vu de ces données, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en réponse à l'AR, un complexe E3 ligase serait recruté au niveau du LBD selon le mode de recrutement des coactivateurs qui nécessite au préalable les changements conformationnels affectant notamment l'hélice H12. La phosphorylation de la sérine 369 pourrait influencer ce recrutement soit indirectement *via* des changements de structure soit directement en reconnaissant le complexe E3. En effet, une étude récente a montré que AhR jusqu'alors considéré comme un activateur transcriptionnel de ER et d'AR, s'associe avec Cul4 et joue également le rôle de E3 ligase vis-à-vis des deux récepteurs (Ohtake et al., 2009). Nous ne pouvons donc pas exclure qu'un interactant de RAR α participant à la transcription et interagissant avec le LBD puisse également jouer le rôle de E3 ligase. Cependant d'après les résultats du criblage, nous pouvons écarter la possibilité de l'implication de complexes CRL puisqu'aucun siRNA dirigé contre les cullines ou Rbx1 n'a inhibé la

dégradation de RAR α en réponse à l'AR. Il reste à présent à valider cette hypothèse et à mettre en évidence la E3 impliquée dans la reconnaissance de RAR α et dans son ubiquitination en réponse à l'AR. L'analyse par spectrométrie de masse de complexes associés à RAR α devrait permettre de répondre à cette question.

C. Conclusion

Toutes ces données mettent en exergue différents niveaux de régulation de la réponse à l'AR.

1. Un niveau spécifique et général *via* RAR α qui est le facteur de transcription spécifique de la réponse à l'AR
2. Un niveau de régulation supérieur, varié et global *via* le protéasome qui intervient aussi bien dans l'initiation de la transcription des gènes cibles de l'AR que dans la dégradation finale des différents acteurs, ainsi que dans les étapes intermédiaires de ces deux mécanismes.
3. Un niveau de régulation inférieur représenté par les modifications post-traductionnelles et en particulier les phosphorylations qui régulent finement les mécanismes sous-jacents de la réponse. Les PTM et le code qu'elles forment aiguillent et régulent l'activité des différents corégulateurs afin que leur action soit spécifique d'un signal et d'un RN. SRC-3 en est un très bon exemple. Son mode d'action est relativement le même dans le contexte de ER ou des RAR : en réponse aux ligands, SRC-3 est recruté avec les récepteurs au niveau des promoteurs des gènes cibles, participant ainsi à leur transcription. Puis, sa phosphorylation induit son ubiquitination et sa dégradation. Cependant, les cinétiques, les sites de phosphorylation, les kinases et complexes E3 ubiquitine ligases impliqués diffèrent selon les signaux et les différents types de RN (Gianni et al., 2006; Wu et al., 2007). Les PTM permettraient donc d'impliquer une même protéine dans des mécanismes différents en réponse à des stimuli distincts.

Nous pourrions étendre ce concept à l'ensemble des RN qui semblent agir selon un modèle commun. Ainsi, les RN seraient les effecteurs spécifiques de signaux différents régulés finement par des PTM dans une mécanistique bien plus complexe et plus globale "supervisée" par le protéasome.

Références bibliographiques

- Adam-Stitah, S., Penna, L., Chambon, P., and Rochette-Egly, C.** (1999). Hyperphosphorylation of the retinoid X receptor alpha by activated c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem* 274, 18932-18941.
- Aggarwal, S., Kim, S.W., Cheon, K., Tabassam, F.H., Yoon, J.H., and Koo, J.S.** (2006). Nonclassical action of retinoic acid on the activation of the cAMP response element-binding protein in normal human bronchial epithelial cells. *Mol Biol Cell* 17, 566-575.
- Ahmad, K.F., Engel, C.K., and Prive, G.G.** (1998). Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12123-12128.
- Alique, M., Moreno, V., Kitamura, M., Xu, Q., and Lucio-Cazana, F.J.** (2006). Kinase-dependent, retinoic acid receptor-independent up-regulation of cyclooxygenase-2 by all-trans retinoic acid in human mesangial cells. *Br J Pharmacol* 149, 215-225.
- Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Jr., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N., and DePinho, R.A.** (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* 387, 49-55.
- Alsayed, Y., Uddin, S., Mahmud, N., Lekmine, F., Kalvakolanu, D.V., Minucci, S., Bokoch, G., and Plataniias, L.C.** (2001). Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to all-trans-retinoic acid. *J Biol Chem* 276, 4012-4019.
- Amazit, L., Pasini, L., Szafran, A.T., Berno, V., Wu, R.C., Mielke, M., Jones, E.D., Mancini, M.G., Hinojos, C.A., O'Malley, B.W., et al.** (2007). Regulation of SRC-3 intercompartmental dynamics by estrogen receptor and phosphorylation. *Mol Cell Biol* 27, 6913-6932.
- Amerik, A.Y., and Hochstrasser, M.** (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1695, 189-207.
- Andrau, J.C., van de Pasch, L., Lijnzaad, P., Bijma, T., Koerkamp, M.G., van de Peppel, J., Werner, M., and Holstege, F.C.** (2006). Genome-wide location of the coactivator mediator: Binding without activation and transient Cdk8 interaction on DNA. *Mol Cell* 22, 179-192.
- Angers, S., Li, T., Yi, X., MacCoss, M.J., Moon, R.T., and Zheng, N.** (2006). Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature* 443, 590-593.
- Anzick, S.L., Kononen, J., Walker, R.L., Azorsa, D.O., Tanner, M.M., Guan, X.Y., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., Trent, J.M., and Meltzer, P.S.** (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277, 965-968.
- Aoto, J., Nam, C.I., Poon, M.M., Ting, P., and Chen, L.** (2008). Synaptic signaling by all-trans retinoic acid in homeostatic synaptic plasticity. *Neuron* 60, 308-320.
- Aravind, L., and Koonin, E.V.** (2000). The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. *Curr Biol* 10, R132-134.
- Augereau, P., Badia, E., Balaguer, P., Carascossa, S., Castet, A., Jalaguier, S., and Cavailles, V.** (2006). Negative regulation of hormone signaling by RIP140. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102, 51-59.
- Auld, K.L., Brown, C.R., Casolari, J.M., Komili, S., and Silver, P.A.** (2006). Genomic association of the proteasome demonstrates overlapping gene regulatory activity with transcription factor substrates. *Mol Cell* 21, 861-871.
- Bain, D.L., Franden, M.A., McManaman, J.L., Takimoto, G.S., and Horwitz, K.B.** (2001). The N-terminal region of human progesterone B-receptors: biophysical and biochemical comparison to A-receptors. *J Biol Chem* 276, 23825-23831.

- Baker, S.P., and Grant, P.A.** (2005). The proteasome: not just degrading anymore. *Cell* *123*, 361-363.
- Barrandon, C., Spiluttini, B., and Bensaude, O.** (2008). Non-coding RNAs regulating the transcriptional machinery. *Biol Cell* *100*, 83-95.
- Bashor, M.M., Toft, D.O., and Chytil, F.** (1973). In vitro binding of retinol to rat-tissue components. *Proc Natl Acad Sci U S A* *70*, 3483-3487.
- Bastien, J., Adam-Stitah, S., Plassat, J.L., Chambon, P., and Rochette-Egly, C.** (2002). The phosphorylation site located in the A region of retinoic X receptor alpha is required for the antiproliferative effect of retinoic acid (RA) and the activation of RA target genes in F9 cells. *J Biol Chem* *277*, 28683-28689.
- Bastien, J., Adam-Stitah, S., Riedl, T., Egly, J.M., Chambon, P., and Rochette-Egly, C.** (2000). TFIIF interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *J Biol Chem* *275*, 21896-21904.
- Bastien, J., Plassat, J.L., Payrastra, B., and Rochette-Egly, C.** (2006). The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway is essential for the retinoic acid-induced differentiation of F9 cells. *Oncogene* *25*, 2040-2047.
- Bastien, J., and Rochette-Egly, C.** (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* *328*, 1-16.
- Bedford, L., Paine, S., Sheppard, P.W., Mayer, R.J., and Roelofs, J.** (2010). Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol* *20*, 391-401.
- Benirschke, R.C., Thompson, J.R., Nomine, Y., Wasielewski, E., Juranic, N., Macura, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Botuyan, M.V., and Mer, G.** (2010). Molecular basis for the association of human E4B U box ubiquitin ligase with E2-conjugating enzymes UbcH5c and Ubc4. *Structure* *18*, 955-965.
- Bhat, K.P., Turner, J.D., Myers, S.E., Cape, A.D., Ting, J.P., and Greer, S.F.** (2008). The 19S proteasome ATPase Sug1 plays a critical role in regulating MHC class II transcription. *Mol Immunol* *45*, 2214-2224.
- Biddie, S.C., John, S., and Hager, G.L.** (2010). Genome-wide mechanisms of nuclear receptor action. *Trends Endocrinol Metab* *21*, 3-9.
- Bielska, A.A., and Zondlo, N.J.** (2006). Hyperphosphorylation of tau induces local polyproline II helix. *Biochemistry* *45*, 5527-5537.
- Blume-Jensen, P., and Hunter, T.** (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* *411*, 355-365.
- Bose, S., Stratford, F.L., Broadfoot, K.I., Mason, G.G., and Rivett, A.J.** (2004). Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. *Biochem J* *378*, 177-184.
- Bost, F., Caron, L., Marchetti, I., Dani, C., Le Marchand-Brustel, Y., and Binetruy, B.** (2002). Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitment into the adipocyte lineage. *Biochem J* *361*, 621-627.
- Bosu, D.R., and Kipreos, E.T.** (2008). Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles. *Cell Div* *3*, 7.
- Boudjelal, M., Taneja, R., Matsubara, S., Bouillet, P., Dolle, P., and Chambon, P.** (1997). Overexpression of Stra13, a novel retinoic acid-inducible gene of the basic helix-loop-helix family, inhibits mesodermal and promotes neuronal differentiation of P19 cells. *Genes Dev* *11*, 2052-2065.
- Boudjelal, M., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J.** (2002). Retinoid signaling is attenuated by proteasome-mediated degradation of retinoid receptors in human keratinocyte HaCaT cells. *Exp Cell Res* *274*, 130-137.

- Boudjelal, M., Wang, Z., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J.** (2000). Ubiquitin/proteasome pathway regulates levels of retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha in human keratinocytes. *Cancer Res* 60, 2247-2252.
- Bour, G., Gaillard, E., Bruck, N., Lalevee, S., Plassat, J.L., Busso, D., Samama, J.P., and Rochette-Egly, C.** (2005a). Cyclin H binding to the RARalpha activation function (AF)-2 domain directs phosphorylation of the AF-1 domain by cyclin-dependent kinase 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16608-16613.
- Bour, G., Lalevee, S., and Rochette-Egly, C.** (2007). Protein kinases and the proteasome join in the combinatorial control of transcription by nuclear retinoic acid receptors. *Trends Cell Biol* 17, 302-309.
- Bour, G., Plassat, J.L., Bauer, A., Lalevee, S., and Rochette-Egly, C.** (2005b). Vinexin beta interacts with the non-phosphorylated AF-1 domain of retinoid receptor gamma (RARgamma) and represses RARgamma-mediated transcription. *J Biol Chem* 280, 17027-17037.
- Bourguet, W., Germain, P., and Gronemeyer, H.** (2000a). Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci* 21, 381-388.
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D.** (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* 375, 377-382.
- Bourguet, W., Vivat, V., Wurtz, J.M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D.** (2000b). Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. *Mol Cell* 5, 289-298.
- Boutet, S.C., Disatnik, M.H., Chan, L.S., Iori, K., and Rando, T.A.** (2007). Regulation of Pax3 by proteasomal degradation of monoubiquitinated protein in skeletal muscle progenitors. *Cell* 130, 349-362.
- Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D., and Schmidt, M.** (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* 1, 221-226.
- Braun, K.W., Tribley, W.A., Griswold, M.D., and Kim, K.H.** (2000). Follicle-stimulating hormone inhibits all-trans-retinoic acid-induced retinoic acid receptor alpha nuclear localization and transcriptional activation in mouse Sertoli cell lines. *J Biol Chem* 275, 4145-4151.
- Braun, K.W., Vo, M.N., and Kim, K.H.** (2002). Positive regulation of retinoic acid receptor alpha by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase in sertoli cells. *Biol Reprod* 67, 29-37.
- Brelivet, Y., Kammerer, S., Rochel, N., Poch, O., and Moras, D.** (2004). Signature of the oligomeric behaviour of nuclear receptors at the sequence and structural level. *EMBO Rep* 5, 423-429.
- Brondani, V., Schefer, Q., Hamy, F., and Klimkait, T.** (2005). The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates phospho-Ser77 retinoic acid receptor alpha stability. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 6-13.
- Bruck, N., Bastien, J., Bour, G., Tarrade, A., Plassat, J.L., Bauer, A., Adam-Stitah, S., and Rochette-Egly, C.** (2005). Phosphorylation of the retinoid x receptor at the omega loop, modulates the expression of retinoic-acid-target genes with a promoter context specificity. *Cell Signal* 17, 1229-1239.
- Bruck, N., Vitoux, D., Ferry, C., Duong, V., Bauer, A., de The, H., and Rochette-Egly, C.** (2009). A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RARalpha to target promoters. *Embo J* 28, 34-47.
- Budhu, A., Gillilan, R., and Noy, N.** (2001). Localization of the RAR interaction domain of cellular retinoic acid binding protein-II. *J Mol Biol* 305, 939-949.

- Budhu, A.S., and Noy, N.** (2002). Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol Cell Biol* *22*, 2632-2641.
- Bullock, A.N., Debreczeni, J.E., Edwards, A.M., Sundstrom, M., and Knapp, S.** (2006). Crystal structure of the SOCS2-elongin C-elongin B complex defines a prototypical SOCS box ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 7637-7642.
- Burroughs, A.M., Jaffee, M., Iyer, L.M., and Aravind, L.** (2008). Anatomy of the E2 ligase fold: implications for enzymology and evolution of ubiquitin/Ub-like protein conjugation. *J Struct Biol* *162*, 205-218.
- Canon, E., Cosgaya, J.M., Scsucova, S., and Aranda, A.** (2004). Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell* *15*, 5583-5592.
- Capili, A.D., Schultz, D.C., Rauscher, I.F., and Borden, K.L.** (2001). Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains. *EMBO J* *20*, 165-177.
- Cascio, P., Call, M., Petre, B.M., Walz, T., and Goldberg, A.L.** (2002). Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. *EMBO J* *21*, 2636-2645.
- Cavaillès, V., Dauvois, S., Danielian, P.S., and Parker, M.G.** (1994). Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 10009-10013.
- Cavaillès, V., Dauvois, S., L'Horset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P.J., and Parker, M.G.** (1995). Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J* *14*, 3741-3751.
- Chai, Z., Yang, L., Yu, B., He, Q., Li, W.I., Zhou, R., Zhang, T., Zheng, X., and Xie, J.** (2009). p38 mitogen-activated protein kinase-dependent regulation of SRC-3 and involvement in retinoic acid receptor alpha signaling in embryonic cortical neurons. *IUBMB Life* *61*, 670-678.
- Chambon, P.** (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* *10*, 940-954.
- Chambon, P.** (2005). The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. *Mol Endocrinol* *19*, 1418-1428.
- Chandra, V., Huang, P., Hamuro, Y., Raghuram, S., Wang, Y., Burriss, T.P., and Rastinejad, F.** (2008). Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature* *456*, 350-356.
- Chang, C., Norris, J.D., Gron, H., Paige, L.A., Hamilton, P.T., Kenan, D.J., Fowlkes, D., and McDonnell, D.P.** (1999). Dissection of the LXXLL nuclear receptor-coactivator interaction motif using combinatorial peptide libraries: discovery of peptide antagonists of estrogen receptors alpha and beta. *Mol Cell Biol* *19*, 8226-8239.
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., and Varshavsky, A.** (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* *243*, 1576-1583.
- Chen, J., Kinyamu, H.K., and Archer, T.K.** (2006). Changes in attitude, changes in latitude: nuclear receptors remodeling chromatin to regulate transcription. *Mol Endocrinol* *20*, 1-13.
- Chen, J.D., and Evans, R.M.** (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* *377*, 454-457.
- Chen, N., and Napoli, J.L.** (2008). All-trans-retinoic acid stimulates translation and induces spine formation in hippocampal neurons through a membrane-associated RARalpha. *FASEB J* *22*, 236-245.
- Chen, N., Onisko, B., and Napoli, J.L.** (2008). The nuclear transcription factor RARalpha associates with neuronal RNA granules and suppresses translation. *J Biol Chem* *283*, 20841-20847.

- Chen, Z.J., and Sun, L.J.** (2009). Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell* *33*, 275-286.
- Cheng, S.C., Tarn, W.Y., Tsao, T.Y., and Abelson, J.** (1993). PRP19: a novel spliceosomal component. *Mol Cell Biol* *13*, 1876-1882.
- Cheung, P., Tanner, K.G., Cheung, W.L., Sassone-Corsi, P., Denu, J.M., and Allis, C.D.** (2000). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell* *5*, 905-915.
- Cocchetti, P., Tripodi, F., Tedeschi, G., Nonnis, S., Marin, O., Fantinato, S., Cirulli, C., Vanoni, M., and Alberghina, L.** (2008). The CK2 phosphorylation of catalytic domain of Cdc34 modulates its activity at the G1 to S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Cycle* *7*, 1391-1401.
- Cohen, R.N., Brzostek, S., Kim, B., Chorev, M., Wondisford, F.E., and Hollenberg, A.N.** (2001). The specificity of interactions between nuclear hormone receptors and corepressors is mediated by distinct amino acid sequences within the interacting domains. *Mol Endocrinol* *15*, 1049-1061.
- Colley, S.M., and Leedman, P.J.** (2009). SRA and its binding partners: an expanding role for RNA-binding coregulators in nuclear receptor-mediated gene regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* *44*, 25-33.
- Collins, G.A., and Tansey, W.P.** (2006). The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr Opin Genet Dev* *16*, 197-202.
- Coscoy, L., Sanchez, D.J., and Ganem, D.** (2001). A novel class of herpesvirus-encoded membrane-bound E3 ubiquitin ligases regulates endocytosis of proteins involved in immune recognition. *J Cell Biol* *155*, 1265-1273.
- Coste, A., Antal, M.C., Chan, S., Kastner, P., Mark, M., O'Malley, B.W., and Auwerx, J.** (2006). Absence of the steroid receptor coactivator-3 induces B-cell lymphoma. *EMBO J* *25*, 2453-2464.
- Dace, A., Zhao, L., Park, K.S., Furuno, T., Takamura, N., Nakanishi, M., West, B.L., Hanover, J.A., and Cheng, S.** (2000). Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 8985-8990.
- Dahlman-Wright, K., Baumann, H., McEwan, I.J., Almlof, T., Wright, A.P., Gustafsson, J.A., and Hard, T.** (1995). Structural characterization of a minimal functional transactivation domain from the human glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 1699-1703.
- Darimont, B.D., Wagner, R.L., Apriletti, J.W., Stallcup, M.R., Kushner, P.J., Baxter, J.D., Fletterick, R.J., and Yamamoto, K.R.** (1998). Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev* *12*, 3343-3356.
- de Lera, A.R., Bourguet, W., Altucci, L., and Gronemeyer, H.** (2007). Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. *Nat Rev Drug Discov* *6*, 811-820.
- de The, H., Vivanco-Ruiz, M.M., Tiollais, P., Stunnenberg, H., and Dejean, A.** (1990). Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature* *343*, 177-180.
- Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, L.M., and Alessi, D.R.** (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J* *17*, 4426-4441.
- Delacroix, L., Moutier, E., Altobelli, G., Legras, S., Poch, O., Choukrallah, M.A., Bertin, I., Jost, B., and Davidson, I.** (2010). Cell-specific interaction of retinoic acid receptors with target genes in mouse embryonic fibroblasts and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* *30*, 231-244.

- Delmotte, M.H., Tahayato, A., Formstecher, P., and Lefebvre, P.** (1999). Serine 157, a retinoic acid receptor alpha residue phosphorylated by protein kinase C in vitro, is involved in RXR.RARalpha heterodimerization and transcriptional activity. *J Biol Chem* 274, 38225-38231.
- Delva, L., Bastie, J.N., Rochette-Egly, C., Kraiba, R., Balitrand, N., Despouy, G., Chambon, P., and Chomienne, C.** (1999). Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol Cell Biol* 19, 7158-7167.
- Dembla-Rajpal, N., Seipelt, R., Wang, Q., and Rymond, B.C.** (2004). Proteasome inhibition alters the transcription of multiple yeast genes. *Biochim Biophys Acta* 1680, 34-45.
- Dennis, A.P., Lonard, D.M., Nawaz, Z., and O'Malley, B.W.** (2005). Inhibition of the 26S proteasome blocks progesterone receptor-dependent transcription through failed recruitment of RNA polymerase II. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94, 337-346.
- Dennis, A.P., and O'Malley, B.W.** (2005). Rush hour at the promoter: how the ubiquitin-proteasome pathway polices the traffic flow of nuclear receptor-dependent transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93, 139-151.
- Deshaies, R.J., and Joazeiro, C.A.** (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78, 399-434.
- Despouy, G., Bastie, J.N., Deshaies, S., Balitrand, N., Mazharian, A., Rochette-Egly, C., Chomienne, C., and Delva, L.** (2003). Cyclin D3 is a cofactor of retinoic acid receptors, modulating their activity in the presence of cellular retinoic acid-binding protein II. *J Biol Chem* 278, 6355-6362.
- Dey, N., De, P.K., Wang, M., Zhang, H., Dobrota, E.A., Robertson, K.A., and Durden, D.L.** (2007). CSK controls retinoic acid receptor (RAR) signaling: a RAR-c-SRC signaling axis is required for neurogenic differentiation. *Mol Cell Biol* 27, 4179-4197.
- Dilworth, F.J., and Chambon, P.** (2001). Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* 20, 3047-3054.
- Dolle, P.** (2009). Developmental expression of retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal* 7, e006.
- Dong, S., Stenoien, D.L., Qiu, J., Mancini, M.A., and Tweardy, D.J.** (2004). Reduced intranuclear mobility of APL fusion proteins accompanies their mislocalization and results in sequestration and decreased mobility of retinoid X receptor alpha. *Mol Cell Biol* 24, 4465-4475.
- Driscoll, J.E., Seachord, C.L., Lupisella, J.A., Darveau, R.P., and Reczek, P.R.** (1996). Ligand-induced conformational changes in the human retinoic acid receptor detected using monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 271, 22969-22975.
- Dunn, K.L., Espino, P.S., Drobic, B., He, S., and Davie, J.R.** (2005). The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. *Biochem Cell Biol* 83, 1-14.
- Dupe, V., Davenne, M., Brocard, J., Dolle, P., Mark, M., Dierich, A., Chambon, P., and Rijli, F.M.** (1997). In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* 124, 399-410.
- Durand, B., Saunders, M., Leroy, P., Leid, M., and Chambon, P.** (1992). All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. *Cell* 71, 73-85.
- Dye, B.T., and Schulman, B.A.** (2007). Structural mechanisms underlying posttranslational modification by ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36, 131-150.

- Dyson, H.J., and Wright, P.E.** (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 197-208.
- Egea, P.F., Rochel, N., Birck, C., Vachette, P., Timmins, P.A., and Moras, D.** (2001). Effects of ligand binding on the association properties and conformation in solution of retinoic acid receptors RXR and RAR. *J Mol Biol* 307, 557-576.
- Elmlund, H., Baraznenok, V., Lindahl, M., Samuelson, C.O., Koeck, P.J., Holmberg, S., Hebert, H., and Gustafsson, C.M.** (2006). The cyclin-dependent kinase 8 module sterically blocks Mediator interactions with RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15788-15793.
- Elsasser, S., Chandler-Militello, D., Muller, B., Hanna, J., and Finley, D.** (2004). Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *J Biol Chem* 279, 26817-26822.
- Ezhkova, E., and Tansey, W.P.** (2004). Proteasomal ATPases link ubiquitylation of histone H2B to methylation of histone H3. *Mol Cell* 13, 435-442.
- Faist, F., Short, S., Kneale, G.G., and Sharpe, C.R.** (2009). Alternative splicing determines the interaction of SMRT isoforms with nuclear receptor-DNA complexes. *Biosci Rep* 29, 143-149.
- Farboud, B., Hauksdottir, H., Wu, Y., and Privalsky, M.L.** (2003). Isotype-restricted corepressor recruitment: a constitutively closed helix 12 conformation in retinoic acid receptors beta and gamma interferes with corepressor recruitment and prevents transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 23, 2844-2858.
- Farboud, B., and Privalsky, M.L.** (2004). Retinoic acid receptor-alpha is stabilized in a repressive state by its C-terminal, isotype-specific F domain. *Mol Endocrinol* 18, 2839-2853.
- Farooqui, M., Franco, P.J., Thompson, J., Kagechika, H., Chandraratna, R.A., Banaszak, L., and Wei, L.N.** (2003). Effects of retinoid ligands on RIP140: molecular interaction with retinoid receptors and biological activity. *Biochemistry* 42, 971-979.
- Ferdous, A., Gonzalez, F., Sun, L., Kodadek, T., and Johnston, S.A.** (2001). The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* 7, 981-991.
- Ferdous, A., Kodadek, T., and Johnston, S.A.** (2002). A nonproteolytic function of the 19S regulatory subunit of the 26S proteasome is required for efficient activated transcription by human RNA polymerase II. *Biochemistry* 41, 12798-12805.
- Fereshteh, M.P., Tilli, M.T., Kim, S.E., Xu, J., O'Malley, B.W., Wellstein, A., Furth, P.A., and Riegel, A.T.** (2008). The nuclear receptor coactivator amplified in breast cancer-1 is required for Neu (ErbB2/HER2) activation, signaling, and mammary tumorigenesis in mice. *Cancer Res* 68, 3697-3706.
- Fernandes, I., Bastien, Y., Wai, T., Nygard, K., Lin, R., Cormier, O., Lee, H.S., Eng, F., Bertos, N.R., Pelletier, N., et al.** (2003). Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell* 11, 139-150.
- Ferrero, M., Avivar, A., Garcia-Macias, M.C., and de Mora, J.F.** (2008). Phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling can promote AIB1 stability independently of GSK3 phosphorylation. *Cancer Res* 68, 5450-5459.
- Finley, D.** (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem* 78, 477-513.
- Flajollet, S., Lefebvre, B., Rachez, C., and Lefebvre, P.** (2006). Distinct roles of the steroid receptor coactivator 1 and of MED1 in retinoid-induced transcription and cellular differentiation. *J Biol Chem* 281, 20338-20348.

- Fleming, J.A., Lightcap, E.S., Sadis, S., Thoroddsen, V., Bulawa, C.E., and Blackman, R.K.** (2002). Complementary whole-genome technologies reveal the cellular response to proteasome inhibition by PS-341. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1461-1466.
- Flick, K., Ouni, I., Wohlschlegel, J.A., Capati, C., McDonald, W.H., Yates, J.R., and Kaiser, P.** (2004). Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain. *Nat Cell Biol* 6, 634-641.
- Font de Mora, J., and Brown, M.** (2000). AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 20, 5041-5047.
- Fraser, R.A., Rossignol, M., Heard, D.J., Egly, J.M., and Chambon, P.** (1997). SUG1, a putative transcriptional mediator and subunit of the PA700 proteasome regulatory complex, is a DNA helicase. *J Biol Chem* 272, 7122-7126.
- Freedman, L.P., Luisi, B.F., Korszun, Z.R., Basavappa, R., Sigler, P.B., and Yamamoto, K.R.** (1988). The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* 334, 543-546.
- Fried, H., and Kutay, U.** (2003). Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* 60, 1659-1688.
- Fu, H., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., van Nocker, S., Finley, D., and Vierstra, R.D.** (1998). Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcb1. *J Biol Chem* 273, 1970-1981.
- Gaillard, E., Bruck, N., Brelivet, Y., Bour, G., Lalevee, S., Bauer, A., Poch, O., Moras, D., and Rochette-Egly, C.** (2006). Phosphorylation by PKA potentiates retinoic acid receptor alpha activity by means of increasing interaction with and phosphorylation by cyclin H/cdk7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9548-9553.
- Gallastegui, N., and Groll, M.** (2010). The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends Biochem Sci*.
- Gampe, R.T., Jr., Montana, V.G., Lambert, M.H., Miller, A.B., Bledsoe, R.K., Milburn, M.V., Kliewer, S.A., Willson, T.M., and Xu, H.E.** (2000). Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol Cell* 5, 545-555.
- Garabedian, M.J., and Logan, S.K.** (2008). Atypical regulation of SRC-3. *Trends Biochem Sci* 33, 301-304.
- Gardner, K.H., and Montminy, M.** (2005). Can you hear me now? Regulating transcriptional activators by phosphorylation. *Sci STKE* 2005, pe44.
- Gehin, M., Vivat, V., Wurtz, J.M., Losson, R., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H.** (1999). Structural basis for engineering of retinoic acid receptor isotype-selective agonists and antagonists. *Chem Biol* 6, 519-529.
- Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, R.M., Lazar, M.A., Leid, M., De Lera, A.R., Lotan, R., Mangelsdorf, D.J., and Gronemeyer, H.** (2006a). International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol Rev* 58, 712-725.
- Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, R.M., Lazar, M.A., Leid, M., De Lera, A.R., Lotan, R., Mangelsdorf, D.J., and Gronemeyer, H.** (2006b). International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev* 58, 760-772.
- Germain, P., Iyer, J., Zechel, C., and Gronemeyer, H.** (2002). Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy. *Nature* 415, 187-192.

- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., and Laudet, V.** (2006c). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58, 685-704.
- Giamas, G., Castellano, L., Feng, Q., Knippschild, U., Jacob, J., Thomas, R.S., Coombes, R.C., Smith, C.L., Jiao, L.R., and Stebbing, J.** (2009). CK1delta modulates the transcriptional activity of ERalpha via AIB1 in an estrogen-dependent manner and regulates ERalpha-AIB1 interactions. *Nucleic Acids Res* 37, 3110-3123.
- Gianni, M., Bauer, A., Garattini, E., Chambon, P., and Rochette-Egly, C.** (2002a). Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR gamma degradation and transactivation. *EMBO J* 21, 3760-3769.
- Gianni, M., Boldetti, A., Guarnaccia, V., Rambaldi, A., Parrella, E., Raska, I., Jr., Rochette-Egly, C., Del Sal, G., Rustighi, A., Terao, M., *et al.*** (2009). Inhibition of the peptidyl-prolyl-isomerase Pin1 enhances the responses of acute myeloid leukemia cells to retinoic acid via stabilization of RARalpha and PML-RARalpha. *Cancer Res* 69, 1016-1026.
- Gianni, M., Kopf, E., Bastien, J., Oulad-Abdelghani, M., Garattini, E., Chambon, P., and Rochette-Egly, C.** (2002b). Down-regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is involved in retinoic acid-induced phosphorylation, degradation, and transcriptional activity of retinoic acid receptor gamma 2. *J Biol Chem* 277, 24859-24862.
- Gianni, M., Parrella, E., Raska, I., Jr., Gaillard, E., Nigro, E.A., Gaudon, C., Garattini, E., and Rochette-Egly, C.** (2006). P38MAPK-dependent phosphorylation and degradation of SRC-3/AIB1 and RARalpha-mediated transcription. *Embo J* 25, 739-751.
- Gianni, M., Tarrade, A., Nigro, E.A., Garattini, E., and Rochette-Egly, C.** (2003). The AF-1 and AF-2 domains of RAR gamma 2 and RXR alpha cooperate for triggering the transactivation and the degradation of RAR gamma 2/RXR alpha heterodimers. *J Biol Chem* 278, 34458-34466.
- Gillespie, R.F., and Gudas, L.J.** (2007). Retinoid regulated association of transcriptional co-regulators and the polycomb group protein SUZ12 with the retinoic acid response elements of Hoxa1, RARbeta(2), and Cyp26A1 in F9 embryonal carcinoma cells. *J Mol Biol* 372, 298-316.
- Gillette, T.G., Gonzalez, F., Delahodde, A., Johnston, S.A., and Kodadek, T.** (2004). Physical and functional association of RNA polymerase II and the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5904-5909.
- Gillette, T.G., Kumar, B., Thompson, D., Slaughter, C.A., and DeMartino, G.N.** (2008). Differential roles of the COOH termini of AAA subunits of PA700 (19 S regulator) in asymmetric assembly and activation of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 283, 31813-31822.
- Goebel, M.G., Goetsch, L., and Byers, B.** (1994). The Ubc3 (Cdc34) ubiquitin-conjugating enzyme is ubiquitinated and phosphorylated in vivo. *Mol Cell Biol* 14, 3022-3029.
- Gojis, O., Rudraraju, B., Gudi, M., Hogben, K., Sousha, S., Coombes, R.C., Cleator, S., and Palmieri, C.** (2010). The role of SRC-3 in human breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 7, 83-89.
- Gonzalez, F., Delahodde, A., Kodadek, T., and Johnston, S.A.** (2002). Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. *Science* 296, 548-550.
- Goodson, M., Jonas, B.A., and Privalsky, M.A.** (2005a). Corepressors: custom tailoring and alterations while you wait. *Nucl Recept Signal* 3, e003.
- Goodson, M.L., Jonas, B.A., and Privalsky, M.L.** (2005b). Alternative mRNA splicing of SMRT creates functional diversity by generating corepressor isoforms with different affinities for different nuclear receptors. *J Biol Chem* 280, 7493-7503.
- Gottschalk, A.J., Conaway, R.C., and Conaway, J.W.** (2008). New clues to actin function in chromatin regulation. *Nat Struct Mol Biol* 15, 432-433.

- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., and Finley, D.** (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 7, 1062-1067.
- Gronemeyer, H., and Bourguet, W.** (2009). Allosteric effects govern nuclear receptor action: DNA appears as a player. *Sci Signal* 2, pe34.
- Grossman, S.R., Deato, M.E., Brignone, C., Chan, H.M., Kung, A.L., Tagami, H., Nakatani, Y., and Livingston, D.M.** (2003). Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* 300, 342-344.
- Guenther, M.G., Barak, O., and Lazar, M.A.** (2001). The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol* 21, 6091-6101.
- Guenther, M.G., Lane, W.S., Fischle, W., Verdin, E., Lazar, M.A., and Shiekhhattar, R.** (2000). A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness. *Genes Dev* 14, 1048-1057.
- Gupta, P., Ho, P.C., Huq, M.M., Ha, S.G., Park, S.W., Khan, A.A., Tsai, N.P., and Wei, L.N.** (2008). Retinoic acid-stimulated sequential phosphorylation, PML recruitment, and SUMOylation of nuclear receptor TR2 to suppress Oct4 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11424-11429.
- Gurevich, I., Flores, A.M., and Aneskievich, B.J.** (2007). Corepressors of agonist-bound nuclear receptors. *Toxicol Appl Pharmacol* 223, 288-298.
- Guyot, R., Vincent, S., Bertin, J., Samarut, J., and Ravel-Chapuis, P.** (2010). The transforming acidic coiled coil (TACC1) protein modulates the transcriptional activity of the nuclear receptors TR and RAR. *BMC Mol Biol* 11, 3.
- Haas, A.L., and Rose, I.A.** (1982). The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis. *J Biol Chem* 257, 10329-10337.
- Haas, A.L., Warms, J.V., Hershko, A., and Rose, I.A.** (1982). Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* 257, 2543-2548.
- Hager, G.L., McNally, J.G., and Misteli, T.** (2009). Transcription dynamics. *Mol Cell* 35, 741-753.
- Hamy, F., Verwaerde, P., Helbecque, N., Formstecher, P., and Henichart, J.P.** (1991). Nuclear targeting of a viral-cointernalized protein by a short signal sequence from human retinoic acid receptors. *Bioconjug Chem* 2, 375-378.
- Han, Y.H., Zhou, H., Kim, J.H., Yan, T.D., Lee, K.H., Wu, H., Lin, F., Lu, N., Liu, J., Zeng, J.Z., et al.** (2009a). A Unique Cytoplasmic Localization of Retinoic Acid Receptor- γ and Its Regulations. *J Biol Chem* 284, 18503-18514.
- Han, Y.H., Zhou, H., Kim, J.H., Yan, T.D., Lee, K.H., Wu, H., Lin, F., Lu, N., Liu, J., Zeng, J.Z., et al.** (2009b). A unique cytoplasmic localization of retinoic acid receptor- γ and its regulations. *J Biol Chem* 284, 18503-18514.
- Hartman, H.B., Yu, J., Alenghat, T., Ishizuka, T., and Lazar, M.A.** (2005). The histone-binding code of nuclear receptor co-repressors matches the substrate specificity of histone deacetylase 3. *EMBO Rep* 6, 445-451.
- Hatchell, E.C., Colley, S.M., Beveridge, D.J., Epis, M.R., Stuart, L.M., Giles, K.M., Redfern, A.D., Miles, L.E., Barker, A., MacDonald, L.M., et al.** (2006). SLIRP, a small SRA binding protein, is a nuclear receptor corepressor. *Mol Cell* 22, 657-668.
- Hauksdottir, H., Farboud, B., and Privalsky, M.L.** (2003). Retinoic acid receptors beta and gamma do not repress, but instead activate target gene transcription in both the absence and presence of hormone ligand. *Mol Endocrinol* 17, 373-385.

- Heery, D.M., Hoare, S., Hussain, S., Parker, M.G., and Sheppard, H.** (2001). Core LXXLL motif sequences in CREB-binding protein, SRC1, and RIP140 define affinity and selectivity for steroid and retinoid receptors. *J Biol Chem* 276, 6695-6702.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M.G.** (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-736.
- Heinzel, T., Lavinsky, R.M., Mullen, T.M., Soderstrom, M., Laherty, C.D., Torchia, J., Yang, W.M., Brard, G., Ngo, S.D., Davie, J.R., et al.** (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 387, 43-48.
- Hendil, K.B., Kriegenburg, F., Tanaka, K., Murata, S., Lauridsen, A.M., Johnsen, A.H., and Hartmann-Petersen, R.** (2009). The 20S proteasome as an assembly platform for the 19S regulatory complex. *J Mol Biol* 394, 320-328.
- Henriques, J.A., Vicente, E.J., Leandro da Silva, K.V., and Schenberg, A.C.** (1989). PSO4: a novel gene involved in error-prone repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 218, 111-124.
- Henry, K.W., Wyce, A., Lo, W.S., Duggan, L.J., Emre, N.C., Kao, C.F., Pillus, L., Shilatifard, A., Osley, M.A., and Berger, S.L.** (2003). Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* 17, 2648-2663.
- Hershko, A., and Ciechanover, A.** (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S., and Ciechanover, A.** (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* 258, 8206-8214.
- Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S.** (2006). Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Mol Cell* 24, 977-984.
- Holmbeck, S.M., Dyson, H.J., and Wright, P.E.** (1998). DNA-induced conformational changes are the basis for cooperative dimerization by the DNA binding domain of the retinoid X receptor. *J Mol Biol* 284, 533-539.
- Hong, S.H., and Privalsky, M.L.** (2000). The SMRT corepressor is regulated by a MEK-1 kinase pathway: inhibition of corepressor function is associated with SMRT phosphorylation and nuclear export. *Mol Cell Biol* 20, 6612-6625.
- Hoppe, T.** (2005). Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci* 30, 183-187.
- Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., et al.** (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.
- Hu, J., McCall, C.M., Ohta, T., and Xiong, Y.** (2004). Targeted ubiquitination of CDT1 by the DDB1-CUL4A-ROC1 ligase in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 6, 1003-1009.
- Hu, X., and Lazar, M.A.** (1999). The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 402, 93-96.
- Huang, D.T., Ayrault, O., Hunt, H.W., Taherbhoy, A.M., Duda, D.M., Scott, D.C., Borg, L.A., Neale, G., Murray, P.J., Roussel, M.F., et al.** (2009). E2-RING expansion of the NEDD8 cascade confers specificity to cullin modification. *Mol Cell* 33, 483-495.
- Huang, L., Kinnucan, E., Wang, G., Beaudenon, S., Howley, P.M., Huibregtse, J.M., and Pavletich, N.P.** (1999). Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science* 286, 1321-1326.

- Huang, P., Chandra, V., and Rastinejad, F.** (2010). Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu Rev Physiol* 72, 247-272.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P.M.** (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5249.
- Hunter, T.** (2007). The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell* 28, 730-738.
- Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K.J., Finley, D., and Dikic, I.** (2008). Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* 453, 481-488.
- Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K.I., and Takahashi, R.** (2002). CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 10, 55-67.
- Isasa, M., Katz, E.J., Kim, W., Yugo, V., Gonzalez, S., Kirkpatrick, D.S., Thomson, T.M., Finley, D., Gygi, S.P., and Crosas, B.** (2010). Monoubiquitination of RPN10 regulates substrate recruitment to the proteasome. *Mol Cell* 38, 733-745.
- Jacobson, A.D., Zhang, N.Y., Xu, P., Han, K.J., Noone, S., Peng, J., and Liu, C.W.** (2009). The lysine 48 and lysine 63 ubiquitin conjugates are processed differently by the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 284, 35485-35494.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D.** (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Joazeiro, C.A., and Weissman, A.M.** (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549-552.
- Joazeiro, C.A., Wing, S.S., Huang, H., Levenson, J.D., Hunter, T., and Liu, Y.C.** (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 286, 309-312.
- Jonas, B.A., Varlakhanova, N., Hayakawa, F., Goodson, M., and Privalsky, M.L.** (2007). Response of SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) and N-CoR (nuclear receptor corepressor) corepressors to mitogen-activated protein kinase kinase cascades is determined by alternative mRNA splicing. *Mol Endocrinol* 21, 1924-1939.
- Jones, P.L., and Shi, Y.B.** (2003). N-CoR-HDAC corepressor complexes: roles in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* 274, 237-268.
- Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C., and Reed, S.I.** (2000). Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell* 102, 303-314.
- Kajiro, M., Hirota, R., Nakajima, Y., Kawanowa, K., So-ma, K., Ito, I., Yamaguchi, Y., Ohie, S.H., Kobayashi, Y., Seino, Y., et al.** (2009). The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nat Cell Biol* 11, 312-319.
- Kallenberger, B.C., Love, J.D., Chatterjee, V.K., and Schwabe, J.W.** (2003). A dynamic mechanism of nuclear receptor activation and its perturbation in a human disease. *Nat Struct Biol* 10, 136-140.
- Kambhampati, S., Li, Y., Verma, A., Sassano, A., Majchrzak, B., Deb, D.K., Parmar, S., Gafis, N., Kalvakolanu, D.V., Rahman, A., et al.** (2003). Activation of protein kinase C delta by all-trans-retinoic acid. *J Biol Chem* 278, 32544-32551.

- Kamura, T., Maenaka, K., Kotoshiba, S., Matsumoto, M., Kohda, D., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Nakayama, K.I.** (2004). VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev* 18, 3055-3065.
- Kang, Z., Pirskanen, A., Janne, O.A., and Palvimo, J.J.** (2002). Involvement of proteasome in the dynamic assembly of the androgen receptor transcription complex. *J Biol Chem* 277, 48366-48371.
- Kao, C.F., Hillyer, C., Tsukuda, T., Henry, K., Berger, S., and Osley, M.A.** (2004). Rad6 plays a role in transcriptional activation through ubiquitylation of histone H2B. *Genes Dev* 18, 184-195.
- Katahira, M., Knegt, R.M., Boelens, R., Eib, D., Schilthuis, J.G., van der Saag, P.T., and Kaptein, R.** (1992). Homo- and heteronuclear NMR studies of the human retinoic acid receptor beta DNA-binding domain: sequential assignments and identification of secondary structure elements. *Biochemistry* 31, 6474-6480.
- Kawakami, T., Chiba, T., Suzuki, T., Iwai, K., Yamanaka, K., Minato, N., Suzuki, H., Shimbara, N., Hidaka, Y., Osaka, F., et al.** (2001). NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3 ligase. *EMBO J* 20, 4003-4012.
- Kay, B.K., Williamson, M.P., and Sudol, M.** (2000a). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* 14, 231-241.
- Kay, L., Nicolay, K., Wieringa, B., Saks, V., and Wallimann, T.** (2000b). Direct evidence for the control of mitochondrial respiration by mitochondrial creatine kinase in oxidative muscle cells in situ. *J Biol Chem* 275, 6937-6944.
- Keriel, A., Stary, A., Sarasin, A., Rochette-Egly, C., and Egly, J.M.** (2002). XPD mutations prevent TFIIH-dependent transactivation by nuclear receptors and phosphorylation of RARalpha. *Cell* 109, 125-135.
- Kim, H.T., Kim, K.P., Lledias, F., Kisselev, A.F., Scaglione, K.M., Skowrya, D., Gygi, S.P., and Goldberg, A.L.** (2007a). Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *J Biol Chem* 282, 17375-17386.
- Kim, S.W., Hong, J.S., Ryu, S.H., Chung, W.C., Yoon, J.H., and Koo, J.S.** (2007b). Regulation of mucin gene expression by CREB via a nonclassical retinoic acid signaling pathway. *Mol Cell Biol* 27, 6933-6947.
- Kinyamu, H.K., Chen, J., and Archer, T.K.** (2005). Linking the ubiquitin-proteasome pathway to chromatin remodeling/modification by nuclear receptors. *J Mol Endocrinol* 34, 281-297.
- Klaholz, B.P., Mitschler, A., and Moras, D.** (2000). Structural basis for isotype selectivity of the human retinoic acid nuclear receptor. *J Mol Biol* 302, 155-170.
- Klaholz, B.P., Renaud, J.P., Mitschler, A., Zusi, C., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D.** (1998). Conformational adaptation of agonists to the human nuclear receptor RAR gamma. *Nat Struct Biol* 5, 199-202.
- Knegt, R.M., Boelens, R., Ganadu, M.L., George, A.V., van der Saag, P.T., and Kaptein, R.** (1993). Heteronuclear ¹¹³Cd-¹H NMR study of metal coordination in the human retinoic acid receptor-beta DNA binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* 192, 492-498.
- Knowles, R.B., Sabry, J.H., Martone, M.E., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Bassell, G.J., and Kosik, K.S.** (1996). Translocation of RNA granules in living neurons. *J Neurosci* 16, 7812-7820.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U., and Jentsch, S.** (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96, 635-644.

- Komander, D.** (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans* 37, 937-953.
- Kopf, E., Plassat, J.L., Vivat, V., de The, H., Chambon, P., and Rochette-Egly, C.** (2000). Dimerization with retinoid X receptors and phosphorylation modulate the retinoic acid-induced degradation of retinoic acid receptors alpha and gamma through the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 275, 33280-33288.
- Kumar, S., Saradhi, M., Chaturvedi, N.K., and Tyagi, R.K.** (2006). Intracellular localization and nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptors: an overview. *Mol Cell Endocrinol* 246, 147-156.
- Kurokawa, R., Soderstrom, M., Horlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K.** (1995). Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* 377, 451-454.
- Kusmierczyk, A.R., and Hochstrasser, M.** (2008). Some assembly required: dedicated chaperones in eukaryotic proteasome biogenesis. *Biol Chem* 389, 1143-1151.
- Kusmierczyk, A.R., Kunjappu, M.J., Funakoshi, M., and Hochstrasser, M.** (2008). A multimeric assembly factor controls the formation of alternative 20S proteasomes. *Nat Struct Mol Biol* 15, 237-244.
- Lahusen, T., Fereshteh, M., Oh, A., Wellstein, A., and Riegel, A.T.** (2007). Epidermal growth factor receptor tyrosine phosphorylation and signaling controlled by a nuclear receptor coactivator, amplified in breast cancer 1. *Cancer Res* 67, 7256-7265.
- Lalevee, S., Bour, G., Quinteret, M., Samarut, E., Kessler, P., Vitorino, M., Bruck, N., Delsuc, M.A., Vonesch, J.L., Kieffer, B., and Rochette-Egly, C.** (2010). Vinexin{beta}, an atypical "sensor" of retinoic acid receptor {gamma} signaling: union and sequestration, separation, and phosphorylation. *FASEB J*.
- Lalli, E., Ohe, K., Hindelang, C., and Sassone-Corsi, P.** (2000). Orphan receptor DAX-1 is a shuttling RNA binding protein associated with polyribosomes via mRNA. *Mol Cell Biol* 20, 4910-4921.
- Lange, C.A., Shen, T., and Horwitz, K.B.** (2000). Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1032-1037.
- Lanz, R.B., McKenna, N.J., Onate, S.A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W.** (1999). A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* 97, 17-27.
- Laserna, E.J., Valero, M.L., Sanz, L., del Pino, M.M., Calvete, J.J., and Baretino, D.** (2009). Proteomic analysis of phosphorylated nuclear proteins underscores novel roles for rapid actions of retinoic acid in the regulation of mRNA splicing and translation. *Mol Endocrinol* 23, 1799-1814.
- Lassot, I., Latreille, D., Rousset, E., Sourisseau, M., Linares, L.K., Chable-Bessia, C., Coux, O., Benkirane, M., and Kiernan, R.E.** (2007). The proteasome regulates HIV-1 transcription by both proteolytic and nonproteolytic mechanisms. *Mol Cell* 25, 369-383.
- Laudet, V., and Gronemeyer, H.** (2002). *The nuclear receptors factsbook*. London: Academic Press.
- Lavery, D.N., and McEwan, I.J.** (2005). Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem J* 391, 449-464.
- Lazar, M.A.** (2003). Nuclear receptor corepressors. *Nucl Recept Signal* 1, e001.
- le Maire, A., Teyssier, C., Erb, C., Grimaldi, M., Alvarez, S., de Lera, A.R., Balaguer, P., Gronemeyer, H., Royer, C.A., Germain, P., and Bouguet, W.** (2010). A unique secondary-structure switch controls constitutive gene repression by retinoic acid receptor. *Nat Struct Mol Biol* 17, 801-807.

- Lee, C.H., Chinpaisal, C., and Wei, L.N.** (1998). Cloning and characterization of mouse RIP140, a corepressor for nuclear orphan receptor TR2. *Mol Cell Biol* *18*, 6745-6755.
- Lee, C.H., and Wei, L.N.** (1999). Characterization of receptor-interacting protein 140 in retinoid receptor activities. *J Biol Chem* *274*, 31320-31326.
- Lee, D., Ezhkova, E., Li, B., Pattenden, S.G., Tansey, W.P., and Workman, J.L.** (2005). The proteasome regulatory particle alters the SAGA coactivator to enhance its interactions with transcriptional activators. *Cell* *123*, 423-436.
- Lee, M.S., Sem, D.S., Kliewer, S.A., Provencal, J., Evans, R.M., and Wright, P.E.** (1994). NMR assignments and secondary structure of the retinoid X receptor alpha DNA-binding domain. Evidence for the novel C-terminal helix. *Eur J Biochem* *224*, 639-650.
- Lefebvre, B., Brand, C., Flajollet, S., and Lefebvre, P.** (2006). Down-regulation of the tumor suppressor gene retinoic acid receptor beta2 through the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Mol Endocrinol* *20*, 2109-2121.
- Lefebvre, B., Mouchon, A., Formstecher, P., and Lefebvre, P.** (1998). H11-H12 loop retinoic acid receptor mutants exhibit distinct trans-activating and trans-repressing activities in the presence of natural or synthetic retinoids. *Biochemistry* *37*, 9240-9249.
- Lefebvre, B., Ozato, K., and Lefebvre, P.** (2002). Phosphorylation of histone H3 is functionally linked to retinoic acid receptor beta promoter activation. *EMBO Rep* *3*, 335-340.
- Lefebvre, P., Martin, P.J., Flajollet, S., Dedieu, S., Billaut, X., and Lefebvre, B.** (2005). Transcriptional activities of retinoic acid receptors. *Vitam Horm* *70*, 199-264.
- Lefstin, J.A., and Yamamoto, K.R.** (1998). Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature* *392*, 885-888.
- Leid, M., Kastner, P., and Chambon, P.** (1992). Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci* *17*, 427-433.
- Li, C., Liang, Y.Y., Feng, X.H., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W.** (2008). Essential phosphatases and a phospho-degron are critical for regulation of SRC-3/AIB1 coactivator function and turnover. *Mol Cell* *31*, 835-849.
- Li, C., Wu, R.C., Amazit, L., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W.** (2007a). Specific amino acid residues in the basic helix-loop-helix domain of SRC-3 are essential for its nuclear localization and proteasome-dependent turnover. *Mol Cell Biol* *27*, 1296-1308.
- Li, C.W., Ai, N., Dinh, G.K., Welsh, W.J., and Chen, J.D.** (2010). Human ADA3 regulates RAR{alpha} transcriptional activity through direct contact between LxxLL motifs and the receptor coactivator pocket. *Nucleic Acids Res.*
- Li, S., and Shang, Y.** (2007). Regulation of SRC family coactivators by post-translational modifications. *Cell Signal* *19*, 1101-1112.
- Li, S.S.** (2005). Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J* *390*, 641-653.
- Li, W., Tu, D., Brunger, A.T., and Ye, Y.** (2007b). A ubiquitin ligase transfers preformed polyubiquitin chains from a conjugating enzyme to a substrate. *Nature* *446*, 333-337.
- Li, X., Amazit, L., Long, W., Lonard, D.M., Monaco, J.J., and O'Malley, B.W.** (2007c). Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma-proteasome pathway. *Mol Cell* *26*, 831-842.

- Li, X., Lonard, D.M., Jung, S.Y., Malovannaya, A., Feng, Q., Qin, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W.** (2006). The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REGgamma proteasome. *Cell* 124, 381-392.
- Liao, Y.P., Ho, S.Y., and Liou, J.C.** (2004). Non-genomic regulation of transmitter release by retinoic acid at developing motoneurons in *Xenopus* cell culture. *J Cell Sci* 117, 2917-2924.
- Lin, H.K., Altuwaijri, S., Lin, W.J., Kan, P.Y., Collins, L.L., and Chang, C.** (2002). Proteasome activity is required for androgen receptor transcriptional activity via regulation of androgen receptor nuclear translocation and interaction with coregulators in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 277, 36570-36576.
- Liou, J.C., Ho, S.Y., Shen, M.R., Liao, Y.P., Chiu, W.T., and Kang, K.H.** (2005). A rapid, nongenomic pathway facilitates the synaptic transmission induced by retinoic acid at the developing synapse. *J Cell Sci* 118, 4721-4730.
- Lipford, J.R., and Deshaies, R.J.** (2003). Diverse roles for ubiquitin-dependent proteolysis in transcriptional activation. *Nat Cell Biol* 5, 845-850.
- Liu, J., and Nussinov, R.** (2010). Rbx1 flexible linker facilitates cullin-RING ligase function before neddylation and after deneddylation. *Biophys J* 99, 736-744.
- Liu, Z., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W.** (2001). Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and p300 enhances progesterone receptor-dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12426-12431.
- Lo, W.S., Trievel, R.C., Rojas, J.R., Duggan, L., Hsu, J.Y., Allis, C.D., Marmorstein, R., and Berger, S.L.** (2000). Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell* 5, 917-926.
- Lonard, D.M., Lanz, R.B., and O'Malley, B.W.** (2007). Nuclear receptor coregulators and human disease. *Endocr Rev* 28, 575-587.
- Lonard, D.M., Nawaz, Z., Smith, C.L., and O'Malley, B.W.** (2000). The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol Cell* 5, 939-948.
- Lonard, D.M., and O'Malley B. W.** (2007). Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Mol Cell* 27, 691-700.
- Lonard, D.M., and O'Malley, B.W.** (2006). The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. *Cell* 125, 411-414.
- Lonard, D.M., Tsai, S.Y., and O'Malley, B.W.** (2004). Selective estrogen receptor modulators 4-hydroxytamoxifen and raloxifene impact the stability and function of SRC-1 and SRC-3 coactivator proteins. *Mol Cell Biol* 24, 14-24.
- Long, W., and O'Malley, B.W.** (2010). Cross-talk among nuclear receptor coactivators and a membrane receptor promotes tumor cell growth and migration. *Cell Cycle* 9.
- Long, W., Yi, P., Amazit, L., LaMarca, H.L., Ashcroft, F., Kumar, R., Mancini, M.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W.** (2010). SRC-3Delta4 mediates the interaction of EGFR with FAK to promote cell migration. *Mol Cell* 37, 321-332.
- Lopez-Andreo, M.J., Torrecillas, A., Conesa-Zamora, P., Corbalan-Garcia, S., and Gomez-Fernandez, J.C.** (2005). Retinoic acid as a modulator of the activity of protein kinase Calpha. *Biochemistry* 44, 11353-11360.

- Lopez-Carballo, G., Moreno, L., Masia, S., Perez, P., and Baretino, D.** (2002). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 277, 25297-25304.
- Loudig, O., Babichuk, C., White, J., Abu-Abed, S., Mueller, C., and Petkovich, M.** (2000). Cytochrome P450RAI(CYP26) promoter: a distinct composite retinoic acid response element underlies the complex regulation of retinoic acid metabolism. *Mol Endocrinol* 14, 1483-1497.
- Lovering, R., Hanson, I.M., Borden, K.L., Martin, S., O'Reilly, N.J., Evan, G.I., Rahman, D., Pappin, D.J., Trowsdale, J., and Freemont, P.S.** (1993). Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2112-2116.
- Lu, Z., Xu, S., Joazeiro, C., Cobb, M.H., and Hunter, T.** (2002). The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. *Mol Cell* 9, 945-956.
- Lukov, G.L., and Goodell, M.A.** (2010). LYL1 degradation by the proteasome is directed by a N-terminal PEST rich site in a phosphorylation-independent manner. *PLoS One* 5.
- Macias, M.J., Wiesner, S., and Sudol, M.** (2002). WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett* 513, 30-37.
- Macoritto, M., Nguyen-Yamamoto, L., Huang, D.C., Samuel, S., Yang, X.F., Wang, T.T., White, J.H., and Kremer, R.** (2008). Phosphorylation of the human retinoid X receptor alpha at serine 260 impairs coactivator(s) recruitment and induces hormone resistance to multiple ligands. *J Biol Chem* 283, 4943-4956.
- Mader, S., Chen, J.Y., Chen, Z., White, J., Chambon, P., and Gronemeyer, H.** (1993a). The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *EMBO J* 12, 5029-5041.
- Mader, S., Leroy, P., Chen, J.Y., and Chambon, P.** (1993b). Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors. *J Biol Chem* 268, 591-600.
- Maghsoodi, B., Poon, M.M., Nam, C.I., Aoto, J., Ting, P., and Chen, L.** (2008). Retinoic acid regulates RARalpha-mediated control of translation in dendritic RNA granules during homeostatic synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16015-16020.
- Mahrour, N., Redwine, W.B., Florens, L., Swanson, S.K., Martin-Brown, S., Bradford, W.D., Staehling-Hampton, K., Washburn, M.P., Conaway, R.C., and Conaway, J.W.** (2008). Characterization of Cullin-box sequences that direct recruitment of Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules to Elongin BC-based ubiquitin ligases. *J Biol Chem* 283, 8005-8013.
- Makino, Y., Yoshida, T., Yogosawa, S., Tanaka, K., Muramatsu, M., and Tamura, T.A.** (1999). Multiple mammalian proteasomal ATPases, but not proteasome itself, are associated with TATA-binding protein and a novel transcriptional activator, TIP120. *Genes Cells* 4, 529-539.
- Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M.** (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.
- Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., Kliewer, S.A., Borgmeyer, U., Ong, E.S., and Evans, R.M.** (1991). A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* 66, 555-561.
- Mani, A., Oh, A.S., Bowden, E.T., Lahusen, T., Lorick, K.L., Weissman, A.M., Schlegel, R., Wellstein, A., and Riegel, A.T.** (2006). E6AP mediates regulated proteasomal degradation of the nuclear receptor coactivator amplified in breast cancer 1 in immortalized cells. *Cancer Res* 66, 8680-8686.
- Marchal, C., Haguener-Tsapis, R., and Urban-Grimal, D.** (1998). A PEST-like sequence mediates phosphorylation and efficient ubiquitination of yeast uracil permease. *Mol Cell Biol* 18, 314-321.

- Mark, M., Ghyselinck, N.B., and Chambon, P.** (2006). Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *46*, 451-480.
- Mark, M., Ghyselinck, N.B., and Chambon, P.** (2009). Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal* *7*, e002.
- Marques, A.J., Palanimurugan, R., Matias, A.C., Ramos, P.C., and Dohmen, R.J.** (2009). Catalytic mechanism and assembly of the proteasome. *Chem Rev* *109*, 1509-1536.
- Martens, J.H., Rao, N.A., and Stunnenberg, H.G.** (2010). Genome-wide interplay of nuclear receptors with the epigenome. *Biochim Biophys Acta*.
- Maruvada, P., Baumann, C.T., Hager, G.L., and Yen, P.M.** (2003). Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J Biol Chem* *278*, 12425-12432.
- Masia, S., Alvarez, S., de Lera, A.R., and Baretino, D.** (2007). Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol* *21*, 2391-2402.
- Masuyama, H., and Hiramatsu, Y.** (2004). Involvement of suppressor for Gal 1 in the ubiquitin/proteasome-mediated degradation of estrogen receptors. *J Biol Chem* *279*, 12020-12026.
- Masuyama, H., Inoshita, H., Hiramatsu, Y., and Kudo, T.** (2002). Ligands have various potential effects on the degradation of pregnane X receptor by proteasome. *Endocrinology* *143*, 55-61.
- Masuyama, H., and MacDonald, P.N.** (1998). Proteasome-mediated degradation of the vitamin D receptor (VDR) and a putative role for SUG1 interaction with the AF-2 domain of VDR. *J Cell Biochem* *71*, 429-440.
- McEwan, I.J.** (2009). Nuclear receptors: one big family. *Methods Mol Biol* *505*, 3-18.
- McEwan, I.J., Lavery, D., Fischer, K., and Watt, K.** (2007). Natural disordered sequences in the amino terminal domain of nuclear receptors: lessons from the androgen and glucocorticoid receptors. *Nucl Recept Signal* *5*, e001.
- Mestas, S.P., and Lumb, K.J.** (1999). Electrostatic contribution of phosphorylation to the stability of the CREB-CBP activator-coactivator complex. *Nat Struct Biol* *6*, 613-614.
- Metivier, R., Penot, G., Hubner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon, F.** (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* *115*, 751-763.
- Mezaki, Y., Yamaguchi, N., Yoshikawa, K., Miura, M., Imai, K., Itoh, H., and Senoo, H.** (2009). Insoluble, speckled cytosolic distribution of retinoic acid receptor alpha protein as a marker of hepatic stellate cell activation in vitro. *J Histochem Cytochem* *57*, 687-699.
- Minsky, N., Shema, E., Field, Y., Schuster, M., Segal, E., and Oren, M.** (2008). Monoubiquitinated H2B is associated with the transcribed region of highly expressed genes in human cells. *Nat Cell Biol* *10*, 483-488.
- Moras, D., and Gronemeyer, H.** (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* *10*, 384-391.
- Morris, M.C., Kaiser, P., Rudyak, S., Baskerville, C., Watson, M.H., and Reed, S.I.** (2003). Cks1-dependent proteasome recruitment and activation of CDC20 transcription in budding yeast. *Nature* *423*, 1009-1013.
- Murata, S., Chiba, T., and Tanaka, K.** (2003). CHIP: a quality-control E3 ligase collaborating with molecular chaperones. *Int J Biochem Cell Biol* *35*, 572-578.

- Murata, S., Yashiroda, H., and Tanaka, K.** (2009). Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 104-115.
- Muratani, M., Kung, C., Shokat, K.M., and Tansey, W.P.** (2005). The F box protein Dsg1/Mdm30 is a transcriptional coactivator that stimulates Gal4 turnover and cotranscriptional mRNA processing. *Cell* 120, 887-899.
- Muratani, M., and Tansey, W.P.** (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 192-201.
- Muscat, G.E., Burke, L.J., and Downes, M.** (1998). The corepressor N-CoR and its variants RIP13a and RIP13Delta1 directly interact with the basal transcription factors TFIIB, TAFII32 and TAFII70. *Nucleic Acids Res* 26, 2899-2907.
- Nagai, J., Yazawa, T., Okudela, K., Kigasawa, H., Kitamura, H., and Osaka, H.** (2004). Retinoic acid induces neuroblastoma cell death by inhibiting proteasomal degradation of retinoic acid receptor alpha. *Cancer Res* 64, 7910-7917.
- Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H., and Chambon, P.** (1993). RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *EMBO J* 12, 2349-2360.
- Nagy, L., Kao, H.Y., Chakravarti, D., Lin, R.J., Hassig, C.A., Ayer, D.E., Schreiber, S.L., and Evans, R.M.** (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89, 373-380.
- Nagy, L., Kao, H.Y., Love, J.D., Li, C., Banayo, E., Gooch, J.T., Krishna, V., Chatterjee, K., Evans, R.M., and Schwabe, J.W.** (1999). Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev* 13, 3209-3216.
- Nakagawa, S., Fujii, T., Yokoyama, G., Kazanietz, M.G., Yamana, H., and Shirouzu, K.** (2003). Cell growth inhibition by all-trans retinoic acid in SKBR-3 breast cancer cells: involvement of protein kinase Calpha and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. *Mol Carcinog* 38, 106-116.
- Napoli, J.L.** (1999). Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1440, 139-162.
- Navon, A., and Goldberg, A.L.** (2001). Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome. *Mol Cell* 8, 1339-1349.
- Nawaz, Z., and O'Malley, B.W.** (2004). Urban renewal in the nucleus: is protein turnover by proteasomes absolutely required for nuclear receptor-regulated transcription? *Mol Endocrinol* 18, 493-499.
- Neri, L.M., Borgatti, P., Tazzari, P.L., Bortul, R., Cappellini, A., Tabellini, G., Bellacosa, A., Capitani, S., and Martelli, A.M.** (2003). The phosphoinositide 3-kinase/AKT1 pathway involvement in drug and all-trans-retinoic acid resistance of leukemia cells. *Mol Cancer Res* 1, 234-246.
- Newton, K., Matsumoto, M.L., Wertz, I.E., Kirkpatrick, D.S., Lill, J.R., Tan, J., Dugger, D., Gordon, N., Sidhu, S.S., Fellouse, F.A., et al.** (2008). Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell* 134, 668-678.
- Ng, H.H., Xu, R.M., Zhang, Y., and Struhl, K.** (2002). Ubiquitination of histone H2B by Rad6 is required for efficient Dot1-mediated methylation of histone H3 lysine 79. *J Biol Chem* 277, 34655-34657.
- Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K., and Bernards, R.** (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123, 773-786.

- Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K., and Milburn, M.V.** (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* *395*, 137-143.
- Nunez, E., Kwon, Y.S., Hutt, K.R., Hu, Q., Cardamone, M.D., Ohgi, K.A., Garcia-Bassets, I., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., et al.** (2008). Nuclear receptor-enhanced transcription requires motor- and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. *Cell* *134*, 189.
- O'Malley, B.W., Qin, J., and Lanz, R.B.** (2008). Cracking the coregulator codes. *Curr Opin Cell Biol* *20*, 310-315.
- Ochoa, W.F., Torrecillas, A., Fita, I., Verdaguer, N., Corbalan-Garcia, S., and Gomez-Fernandez, J.C.** (2003). Retinoic acid binds to the C2-domain of protein kinase C(alpha). *Biochemistry* *42*, 8774-8779.
- Oh, A.S., Lahusen, J.T., Chien, C.D., Fereshteh, M.P., Zhang, X., Dakshanamurthy, S., Xu, J., Kagan, B.L., Wellstein, A., and Riegel, A.T.** (2008). Tyrosine phosphorylation of the nuclear receptor coactivator AIB1/SRC-3 is enhanced by Abl kinase and is required for its activity in cancer cells. *Mol Cell Biol* *28*, 6580-6593.
- Ohashi, E., Kogai, T., Kagechika, H., and Brent, G.A.** (2009). Activation of the PI3 kinase pathway by retinoic acid mediates sodium/iodide symporter induction and iodide transport in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* *69*, 3443-3450.
- Ohtake, F., Fujii-Kuriyama, Y., and Kato, S.** (2009). AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. *Biochem Pharmacol* *77*, 474-484.
- Ordonez-Moran, P., and Munoz, A.** (2009). Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle* *8*, 1675-1680.
- Orlicky, S., Tang, X., Willems, A., Tyers, M., and Sicheri, F.** (2003). Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. *Cell* *112*, 243-256.
- Osburn, D.L., Shao, G., Seidel, H.M., and Schulman, I.G.** (2001). Ligand-dependent degradation of retinoid X receptors does not require transcriptional activity or coactivator interactions. *Mol Cell Biol* *21*, 4909-4918.
- Palijan, A., Fernandes, I., Verway, M., Kourelis, M., Bastien, Y., Tavera-Mendoza, L.E., Sacheli, A., Bourdeau, V., Mader, S., and White, J.H.** (2009). Ligand-dependent corepressor LCoR is an attenuator of progesterone-regulated gene expression. *J Biol Chem* *284*, 30275-30287.
- Park, K.J., Krishnan, V., O'Malley, B.W., Yamamoto, Y., and Gaynor, R.B.** (2005). Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Mol Cell* *18*, 71-82.
- Park, S., Roelofs, J., Kim, W., Robert, J., Schmidt, M., Gygi, S.P., and Finley, D.** (2009). Hexameric assembly of the proteasomal ATPases is templated through their C termini. *Nature* *459*, 866-870.
- Park, U.H., Kim, E.J., and Um, S.J.** (2010). A novel cytoplasmic adaptor for RAR and TR functions as a derepressor of RAR in the absence of retinoic acid. *J Biol Chem*.
- Pascual, J., Martinez-Yamout, M., Dyson, H.J., and Wright, P.E.** (2000). Structure of the PHD zinc finger from human Williams-Beuren syndrome transcription factor. *J Mol Biol* *304*, 723-729.
- Pasquali, D., Chieffi, P., Deery, W.J., Nicoletti, G., Bellastella, A., and Sinisi, A.A.** (2005). Differential effects of all-trans-retinoic acid (RA) on Erk1/2 phosphorylation and cAMP accumulation in normal and malignant human prostate epithelial cells: Erk1/2 inhibition restores RA-induced decrease of cell growth in malignant prostate cells. *Eur J Endocrinol* *152*, 663-669.

- Pavri, R., Lewis, B., Kim, T.K., Dilworth, F.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., de Murcia, G., Evans, R., Chambon, P., and Reinberg, D.** (2005). PARP-1 determines specificity in a retinoid signaling pathway via direct modulation of mediator. *Mol Cell* *18*, 83-96.
- Perissi, V., Aggarwal, A., Glass, C.K., Rose, D.W., and Rosenfeld, M.G.** (2004). A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell* *116*, 511-526.
- Perissi, V., Jepsen, K., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G.** (2010). Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat Rev Genet* *11*, 109-123.
- Perissi, V., and Rosenfeld, M.G.** (2005). Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 542-554.
- Perissi, V., Scafoglio, C., Zhang, J., Ohgi, K.A., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G.** (2008). TBL1 and TBLR1 phosphorylation on regulated gene promoters overcomes dual CtBP and NCoR/SMRT transcriptional repression checkpoints. *Mol Cell* *29*, 755-766.
- Perissi, V., Staszewski, L.M., McInerney, E.M., Kurokawa, R., Krones, A., Rose, D.W., Lambert, M.H., Milburn, M.V., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G.** (1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev* *13*, 3198-3208.
- Perlmann, T., Rangarajan, P.N., Umesono, K., and Evans, R.M.** (1993). Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev* *7*, 1411-1422.
- Petroski, M.D., and Deshaies, R.J.** (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 9-20.
- Pichler, A., Knipscheer, P., Oberhofer, E., van Dijk, W.J., Korner, R., Olsen, J.V., Jentsch, S., Melchior, F., and Sixma, T.K.** (2005). SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nat Struct Mol Biol* *12*, 264-269.
- Pickart, C.M.** (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* *70*, 503-533.
- Pickart, C.M., and Eddins, M.J.** (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* *1695*, 55-72.
- Pintard, L., Willems, A., and Peter, M.** (2004). Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J* *23*, 1681-1687.
- Pintard, L., Willis, J.H., Willems, A., Johnson, J.L., Srayko, M., Kurz, T., Glaser, S., Mains, P.E., Tyers, M., Bowerman, B., et al.** (2003). The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature* *425*, 311-316.
- Pissios, P., Tzamelis, I., Kushner, P., and Moore, D.D.** (2000). Dynamic stabilization of nuclear receptor ligand binding domains by hormone or corepressor binding. *Mol Cell* *6*, 245-253.
- Pogenberg, V., Guichou, J.F., Vivat-Hannah, V., Kammerer, S., Perez, E., Germain, P., de Lera, A.R., Gronemeyer, H., Royer, C.A., and Bourguet, W.** (2005). Characterization of the interaction between retinoic acid receptor/retinoid X receptor (RAR/RXR) heterodimers and transcriptional coactivators through structural and fluorescence anisotropy studies. *J Biol Chem* *280*, 1625-1633.
- Poon, M.M., and Chen, L.** (2008). Retinoic acid-gated sequence-specific translational control by RARalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 20303-20308.
- Privalsky, M.L.** (2004). The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol* *66*, 315-360.
- Prufer, K., and Barsony, J.** (2002). Retinoid X receptor dominates the nuclear import and export of the unliganded vitamin D receptor. *Mol Endocrinol* *16*, 1738-1751.

- Pufall, M.A., Lee, G.M., Nelson, M.L., Kang, H.S., Velyvis, A., Kay, L.E., McIntosh, L.P., and Graves, B.J.** (2005). Variable control of Ets-1 DNA binding by multiple phosphates in an unstructured region. *Science* *309*, 142-145.
- Qian, A., Cai, Y., Magee, T.R., and Wan, Y.J.** (2000). Identification of retinoic acid-responsive elements on the HNF1alpha and HNF4alpha genes. *Biochem Biophys Res Commun* *276*, 837-842.
- Rabl, J., Smith, D.M., Yu, Y., Chang, S.C., Goldberg, A.L., and Cheng, Y.** (2008). Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases. *Mol Cell* *30*, 360-368.
- Radomska-Pandya, A., Chen, G., Czernik, P.J., Little, J.M., Samokyszyn, V.M., Carter, C.A., and Nowak, G.** (2000). Direct interaction of all-trans-retinoic acid with protein kinase C (PKC). Implications for PKC signaling and cancer therapy. *J Biol Chem* *275*, 22324-22330.
- Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R.M., and Sigler, P.B.** (1995). Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* *375*, 203-211.
- Rastinejad, F., Wagner, T., Zhao, Q., and Khorasanizadeh, S.** (2000). Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. *EMBO J* *19*, 1045-1054.
- Ravid, T., and Hochstrasser, M.** (2007). Autoregulation of an E2 enzyme by ubiquitin-chain assembly on its catalytic residue. *Nat Cell Biol* *9*, 422-427.
- Ravid, T., and Hochstrasser, M.** (2008). Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 679-690.
- Rechsteiner, M., and Hill, C.P.** (2005). Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol* *15*, 27-33.
- Rechsteiner, M., and Rogers, S.W.** (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* *21*, 267-271.
- Reid, G., Hubner, M.R., Metivier, R., Brand, H., Denger, S., Manu, D., Beaudouin, J., Ellenberg, J., and Gannon, F.** (2003). Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* *11*, 695-707.
- Reiter, R., Wellstein, A., and Riegel, A.T.** (2001). An isoform of the coactivator AIB1 that increases hormone and growth factor sensitivity is overexpressed in breast cancer. *J Biol Chem* *276*, 39736-39741.
- Renaud, J.P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D.** (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* *378*, 681-689.
- Rochette-Egly, C.** (2003). Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal* *15*, 355-366.
- Rochette-Egly, C.** (2005). Dynamic combinatorial networks in nuclear receptor-mediated transcription. *J Biol Chem* *280*, 32565-32568.
- Rochette-Egly, C., Adam, S., Rossignol, M., Egly, J.M., and Chambon, P.** (1997). Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* *90*, 97-107.
- Rochette-Egly, C., and Germain, P.** (2009). Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal* *7*, e005.
- Rochette-Egly, C., Oulad-Abdelghani, M., Staub, A., Pfister, V., Scheuer, I., Chambon, P., and Gaub, M.P.** (1995). Phosphorylation of the retinoic acid receptor-alpha by protein kinase A. *Mol Endocrinol* *9*, 860-871.

- Rochette-Egly, C., Plassat, J.L., Taneja, R., and Chambon, P.** (2000). The AF-1 and AF-2 activating domains of retinoic acid receptor-alpha (RARalpha) and their phosphorylation are differentially involved in parietal endodermal differentiation of F9 cells and retinoid-induced expression of target genes. *Mol Endocrinol* *14*, 1398-1410.
- Roelofs, J., Park, S., Haas, W., Tian, G., McAllister, F.E., Huo, Y., Lee, B.H., Zhang, F., Shi, Y., Gygi, S.P., et al.** (2009). Chaperone-mediated pathway of proteasome regulatory particle assembly. *Nature* *459*, 861-865.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M.** (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* *234*, 364-368.
- Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V., and Glass, C.K.** (2006). Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* *20*, 1405-1428.
- Rotin, D., and Kumar, S.** (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 398-409.
- Roux, P.P., and Blenis, J.** (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* *68*, 320-344.
- Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Hengartner, C., Young, R.A., Goldberg, A.L., and Finley, D.** (1996). Identification of the gal4 suppressor Sug1 as a subunit of the yeast 26S proteasome. *Nature* *379*, 655-657.
- Sadowski, M., Mawson, A., Baker, R., and Sarcevic, B.** (2007). Cdc34 C-terminal tail phosphorylation regulates Skp1/cullin/F-box (SCF)-mediated ubiquitination and cell cycle progression. *Biochem J* *405*, 569-581.
- Saeki, Y., Kudo, T., Sone, T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A., and Tanaka, K.** (2009). Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J* *28*, 359-371.
- Sande, S., and Privalsky, M.L.** (1996). Identification of TRACs (T3 receptor-associating cofactors), a family of cofactors that associate with, and modulate the activity of, nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol* *10*, 813-825.
- Sato, Y., Yoshikawa, A., Mimura, H., Yamashita, M., Yamagata, A., and Fukai, S.** (2009). Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by tandem UIMs of RAP80. *EMBO J* *28*, 2461-2468.
- Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamagata, A., Mimura, H., Yamashita, M., Ookata, K., Nureki, O., Iwai, K., Komada, M., and Fukai, S.** (2008). Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. *Nature* *455*, 358-362.
- Satoh, K., Sasajima, H., Nyoomura, K.I., Yokosawa, H., and Sawada, H.** (2001). Assembly of the 26S proteasome is regulated by phosphorylation of the p45/Rpt6 ATPase subunit. *Biochemistry* *40*, 314-319.
- Schulman, B.A., Carrano, A.C., Jeffrey, P.D., Bowen, Z., Kinnucan, E.R., Finnin, M.S., Elledge, S.J., Harper, J.W., Pagano, M., and Pavletich, N.P.** (2000). Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature* *408*, 381-386.
- Schwerk, C., Prasad, J., Degenhardt, K., Erdjument-Bromage, H., White, E., Tempst, P., Kidd, V.J., Manley, J.L., Lahti, J.M., and Reinberg, D.** (2003). ASAP, a novel protein complex involved in RNA processing and apoptosis. *Mol Cell Biol* *23*, 2981-2990.
- Seol, W., Mahon, M.J., Lee, Y.K., and Moore, D.D.** (1996). Two receptor interacting domains in the nuclear hormone receptor corepressor RIP13/N-CoR. *Mol Endocrinol* *10*, 1646-1655.

- Shabek, N., Herman-Bachinsky, Y., and Ciechanover, A.** (2009). Ubiquitin degradation with its substrate, or as a monomer in a ubiquitination-independent mode, provides clues to proteasome regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 11907-11912.
- Shabek, N., Iwai, K., and Ciechanover, A.** (2007). Ubiquitin is degraded by the ubiquitin system as a monomer and as part of its conjugated target. *Biochem Biophys Res Commun* *363*, 425-431.
- Shang, F., Deng, G., Liu, Q., Guo, W., Haas, A.L., Crosas, B., Finley, D., and Taylor, A.** (2005). Lys6-modified ubiquitin inhibits ubiquitin-dependent protein degradation. *J Biol Chem* *280*, 20365-20374.
- Shao, W., Keeton, E.K., McDonnell, D.P., and Brown, M.** (2004). Coactivator AIB1 links estrogen receptor transcriptional activity and stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 11599-11604.
- Shi, Y., Downes, M., Xie, W., Kao, H.Y., Ordentlich, P., Tsai, C.C., Hon, M., and Evans, R.M.** (2001). Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation. *Genes Dev* *15*, 1140-1151.
- Shih, S.C., Prag, G., Francis, S.A., Sutanto, M.A., Hurley, J.H., and Hicke, L.** (2003). A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain. *EMBO J* *22*, 1273-1281.
- Shinozaki, Y., Sato, Y., Koizumi, S., Ohno, Y., Nagao, T., and Inoue, K.** (2007). Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-mediated cell death by inhibition of c-jun-N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience* *147*, 153-163.
- Si, J., Mueller, L., and Collins, S.J.** (2007). CaMKII regulates retinoic acid receptor transcriptional activity and the differentiation of myeloid leukemia cells. *J Clin Invest* *117*, 1412-1421.
- Sihn, C.R., Cho, S.Y., Lee, J.H., Lee, T.R., and Kim, S.H.** (2007). Mouse homologue of yeast Prp19 interacts with mouse SUG1, the regulatory subunit of 26S proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* *356*, 175-180.
- Sikder, D., Johnston, S.A., and Kodadek, T.** (2006). Widespread, but non-identical, association of proteasomal 19 and 20 S proteins with yeast chromatin. *J Biol Chem* *281*, 27346-27355.
- Siwak, D.R., Mendoza-Gamboa, E., and Tari, A.M.** (2003). HER2/neu uses Akt to suppress retinoic acid response element binding activity in MDA-MB-453 breast cancer cells. *Int J Oncol* *23*, 1739-1745.
- Smith, W.C., Nakshatri, H., Leroy, P., Rees, J., and Chambon, P.** (1991). A retinoic acid response element is present in the mouse cellular retinol binding protein I (mCRBPI) promoter. *EMBO J* *10*, 2223-2230.
- Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G.R., Rempersaud, N., Dyson, M.H., Hazzalin, C.A., Mahadevan, L.C., and Arthur, J.S.** (2003). MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J* *22*, 2788-2797.
- Sorokin, A.V., Kim, E.R., and Ovchinnikov, L.P.** (2009). Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry (Mosc)* *74*, 1411-1442.
- Sporn, M.B., and Roberts, A.B.** (1994). Cervical dysplasia regression induced by all-trans-retinoic acid. *J Natl Cancer Inst* *86*, 476-477.
- Srinivas, H., Juroske, D.M., Kalyankrishna, S., Cody, D.D., Price, R.E., Xu, X.C., Narayanan, R., Weigel, N.L., and Kurie, J.M.** (2005). c-Jun N-terminal kinase contributes to aberrant retinoid signaling in lung cancer cells by phosphorylating and inducing proteasomal degradation of retinoic acid receptor alpha. *Mol Cell Biol* *25*, 1054-1069.

- Srinivas, H., Xia, D., Moore, N.L., Uray, I.P., Kim, H., Ma, L., Weigel, N.L., Brown, P.H., and Kurie, J.M.** (2006). Akt phosphorylates and suppresses the transactivation of retinoic acid receptor alpha. *Biochem J* 395, 653-662.
- Stanya, K.J., and Kao, H.Y.** (2009). New insights into the functions and regulation of the transcriptional corepressors SMRT and N-CoR. *Cell Div* 4, 7.
- Stanya, K.J., Liu, Y., Means, A.R., and Kao, H.Y.** (2008). Cdk2 and Pin1 negatively regulate the transcriptional corepressor SMRT. *J Cell Biol* 183, 49-61.
- Stebbins, C.E., Kaelin, W.G., Jr., and Pavletich, N.P.** (1999). Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 284, 455-461.
- Stogios, P.J., Downs, G.S., Jauhal, J.J., Nandra, S.K., and Prive, G.G.** (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol* 6, R82.
- Su, K., Yang, X., Roos, M.D., Paterson, A.J., and Kudlow, J.E.** (2000). Human Sug1/p45 is involved in the proteasome-dependent degradation of Sp1. *Biochem J* 348 Pt 2, 281-289.
- Sudol, M., Sliwa, K., and Russo, T.** (2001). Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett* 490, 190-195.
- Sun, K., Montana, V., Chellappa, K., Brelivet, Y., Moras, D., Maeda, Y., Parpura, V., Paschal, B.M., and Sladek, F.M.** (2007). Phosphorylation of a conserved serine in the deoxyribonucleic acid binding domain of nuclear receptors alters intracellular localization. *Mol Endocrinol* 21, 1297-1311.
- Sun, L., Johnston, S.A., and Kodadek, T.** (2002). Physical association of the APIS complex and general transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 991-999.
- Sun, Z.W., and Allis, C.D.** (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418, 104-108.
- Suzuki, H., Chiba, T., Suzuki, T., Fujita, T., Ikenoue, T., Omata, M., Furuichi, K., Shikama, H., and Tanaka, K.** (2000). Homodimer of two F-box proteins betaTrCP1 or betaTrCP2 binds to IkkappaBalpha for signal-dependent ubiquitination. *J Biol Chem* 275, 2877-2884.
- Swaffield, J.C., Bromberg, J.F., and Johnston, S.A.** (1992). Alterations in a yeast protein resembling HIV Tat-binding protein relieve requirement for an acidic activation domain in GAL4. *Nature* 360, 768.
- Tahayato, A., Lefebvre, P., Formstecher, P., and Dautrevaux, M.** (1993). A protein kinase C-dependent activity modulates retinoic acid-induced transcription. *Mol Endocrinol* 7, 1642-1653.
- Takeuchi, T., and Yokosawa, H.** (2005). ISG15 modification of Ubc13 suppresses its ubiquitin-conjugating activity. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 9-13.
- Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, K.B., and Tanaka, K.** (2000). Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 275, 14336-14345.
- Tanaka, K.** (2009). The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85, 12-36.
- Tanaka, T., Rodriguez de la Concepcion, M.L., and De Luca, L.M.** (2001). Involvement of all-trans-retinoic acid in the breakdown of retinoic acid receptors alpha and gamma through proteasomes in MCF-7 human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 61, 1347-1355.
- Taneja, R., Rochette-Egly, C., Plassat, J.L., Penna, L., Gaub, M.P., and Chambon, P.** (1997). Phosphorylation of activation functions AF-1 and AF-2 of RAR alpha and RAR gamma is indispensable for differentiation of F9 cells upon retinoic acid and cAMP treatment. *EMBO J* 16, 6452-6465.
- Tange, T.O., Shibuya, T., Jurica, M.S., and Moore, M.J.** (2005). Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. *Rna* 11, 1869-1883.

- Tari, A.M., Lim, S.J., Hung, M.C., Esteva, F.J., and Lopez-Berestein, G.** (2002). Her2/neu induces all-trans retinoic acid (ATRA) resistance in breast cancer cells. *Oncogene* *21*, 5224-5232.
- Terme, J.M., Lhermitte, L., Asnafi, V., and Jalinot, P.** (2009). TGF-beta induces degradation of TAL1/SCL by the ubiquitin-proteasome pathway through AKT-mediated phosphorylation. *Blood* *113*, 6695-6698.
- Theodosiou, M., Laudet, V., and Schubert, M.** (2010). From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol Life Sci* *67*, 1423-1445.
- Thompson, D., Hakala, K., and DeMartino, G.N.** (2009). Subcomplexes of PA700, the 19 S regulator of the 26 S proteasome, reveal relative roles of AAA subunits in 26 S proteasome assembly and activation and ATPase activity. *J Biol Chem* *284*, 24891-24903.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M.** (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* *19*, 94-102.
- Tiefenbach, J., Novac, N., Ducasse, M., Eck, M., Melchior, F., and Heinzl, T.** (2006). SUMOylation of the corepressor N-CoR modulates its capacity to repress transcription. *Mol Biol Cell* *17*, 1643-1651.
- Torchia, J., Glass, C., and Rosenfeld, M.G.** (1998). Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr Opin Cell Biol* *10*, 373-383.
- Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G.** (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* *387*, 677-684.
- Torres-Arzayus, M.I., Font de Mora, J., Yuan, J., Vazquez, F., Bronson, R., Rue, M., Sellers, W.R., and Brown, M.** (2004). High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene. *Cancer Cell* *6*, 263-274.
- Trempe, J.F., Brown, N.R., Lowe, E.D., Gordon, C., Campbell, I.D., Noble, M.E., and Endicott, J.A.** (2005). Mechanism of Lys48-linked polyubiquitin chain recognition by the Mud1 UBA domain. *EMBO J* *24*, 3178-3189.
- Tyers, M., and Jorgensen, P.** (2000). Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr Opin Genet Dev* *10*, 54-64.
- Um, J.W., Im, E., Park, J., Oh, Y., Min, B., Lee, H.J., Yoon, J.B., and Chung, K.C.** (2010). ASK1 negatively regulates the 26S proteasome. *J Biol Chem*.
- Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C., and Evans, R.M.** (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* *65*, 1255-1266.
- Uruno, A., Sugawara, A., Kanatsuka, H., Kagechika, H., Saito, A., Sato, K., Kudo, M., Takeuchi, K., and Ito, S.** (2005). Upregulation of nitric oxide production in vascular endothelial cells by all-trans retinoic acid through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Circulation* *112*, 727-736.
- Valverde, M.A., and Parker, M.G.** (2002). Classical and novel steroid actions: a unified but complex view. *Trends Biochem Sci* *27*, 172-173.
- van Wijk, S.J., and Timmers, H.T.** (2010). The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J* *24*, 981-993.
- VanDemark, A.P., and Hill, C.P.** (2002). Structural basis of ubiquitylation. *Curr Opin Struct Biol* *12*, 822-830.
- Varadan, R., Assfalg, M., Haririnia, A., Raasi, S., Pickart, C., and Fushman, D.** (2004). Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *J Biol Chem* *279*, 7055-7063.

- Varadan, R., Assfalg, M., Raasi, S., Pickart, C., and Fushman, D.** (2005). Structural determinants for selective recognition of a Lys48-linked polyubiquitin chain by a UBA domain. *Mol Cell* *18*, 687-698.
- Varshavsky, A.** (2005). Regulated protein degradation. *Trends Biochem Sci* *30*, 283-286.
- Ventii, K.H., and Wilkinson, K.D.** (2008). Protein partners of deubiquitinating enzymes. *Biochem J* *414*, 161-175.
- Vermeulen, L., Berghe, W.V., Beck, I.M., De Bosscher, K., and Haegeman, G.** (2009). The versatile role of MSKs in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* *34*, 311-318.
- Vermeulen, M., Carrozza, M.J., Lasonder, E., Workman, J.L., Logie, C., and Stunnenberg, H.G.** (2004). In vitro targeting reveals intrinsic histone tail specificity of the Sin3/histone deacetylase and N-CoR/SMRT corepressor complexes. *Mol Cell Biol* *24*, 2364-2372.
- Vicent, G.P., Ballare, C., Nacht, A.S., Clausell, J., Subtil-Rodriguez, A., Quiles, I., Jordan, A., and Beato, M.** (2006). Induction of progesterone target genes requires activation of Erk and Msk kinases and phosphorylation of histone H3. *Mol Cell* *24*, 367-381.
- Vicent, G.P., Ballare, C., Nacht, A.S., Clausell, J., Subtil-Rodriguez, A., Quiles, I., Jordan, A., and Beato, M.** (2008). Convergence on chromatin of non-genomic and genomic pathways of hormone signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol* *109*, 344-349.
- Vicent, G.P., Zaurin, R., Nacht, A.S., Li, A., Font-Mateu, J., Le Dily, F., Vermeulen, M., Mann, M., and Beato, M.** (2009). Two chromatin remodeling activities cooperate during activation of hormone responsive promoters. *PLoS Genet* *5*, e1000567.
- vom Baur, E., Zechel, C., Heery, D., Heine, M.J., Garnier, J.M., Vivat, V., Le Douarin, B., Gronemeyer, H., Chambon, P., and Losson, R.** (1996). Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J* *15*, 110-124.
- Vosper, J.M., McDowell, G.S., Hindley, C.J., Fiore-Herich, C.S., Kucerova, R., Horan, I., and Philpott, A.** (2009). Ubiquitylation on canonical and non-canonical sites targets the transcription factor neurogenin for ubiquitin-mediated proteolysis. *J Biol Chem* *284*, 15458-15468.
- Vucetic, Z., Zhang, Z., Zhao, J., Wang, F., Soprano, K.J., and Soprano, D.R.** (2008). Acinus-S' represses retinoic acid receptor (RAR)-regulated gene expression through interaction with the B domains of RARs. *Mol Cell Biol* *28*, 2549-2558.
- Walz, J., Erdmann, A., Kania, M., Typke, D., Koster, A.J., and Baumeister, W.** (1998). 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J Struct Biol* *121*, 19-29.
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y.** (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* *431*, 873-878.
- Wang, M., Cheng, D., Peng, J., and Pickart, C.M.** (2006). Molecular determinants of polyubiquitin linkage selection by an HECT ubiquitin ligase. *EMBO J* *25*, 1710-1719.
- Warnmark, A., Treuter, E., Wright, A.P., and Gustafsson, J.A.** (2003). Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol* *17*, 1901-1909.
- Warnmark, A., Wikstrom, A., Wright, A.P., Gustafsson, J.A., and Hard, T.** (2001). The N-terminal regions of estrogen receptor alpha and beta are unstructured in vitro and show different TBP binding properties. *J Biol Chem* *276*, 45939-45944.
- Watkins, R.E., Davis-Searles, P.R., Lambert, M.H., and Redinbo, M.R.** (2003). Coactivator binding promotes the specific interaction between ligand and the pregnane X receptor. *J Mol Biol* *331*, 815-828.

- Weeda, G., Rossignol, M., Fraser, R.A., Winkler, G.S., Vermeulen, W., van 't Veer, L.J., Ma, L., Hoeijmakers, J.H., and Egly, J.M.** (1997). The XPB subunit of repair/transcription factor TFIIH directly interacts with SUG1, a subunit of the 26S proteasome and putative transcription factor. *Nucleic Acids Res* 25, 2274-2283.
- Wei, L.N., Farooqui, M., and Hu, X.** (2001). Ligand-dependent formation of retinoid receptors, receptor-interacting protein 140 (RIP140), and histone deacetylase complex is mediated by a novel receptor-interacting motif of RIP140. *J Biol Chem* 276, 16107-16112.
- Wei, L.N., Hu, X., Chandra, D., Seto, E., and Farooqui, M.** (2000). Receptor-interacting protein 140 directly recruits histone deacetylases for gene silencing. *J Biol Chem* 275, 40782-40787.
- Welchman, R.L., Gordon, C., and Mayer, R.J.** (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 599-609.
- White, J.H., Fernandes, I., Mader, S., and Yang, X.J.** (2004). Corepressor recruitment by agonist-bound nuclear receptors. *Vitam Horm* 68, 123-143.
- Windheim, M., Peggie, M., and Cohen, P.** (2008). Two different classes of E2 ubiquitin-conjugating enzymes are required for the mono-ubiquitination of proteins and elongation by polyubiquitin chains with a specific topology. *Biochem J* 409, 723-729.
- Winn, P.J., Religa, T.L., Battey, J.N., Banerjee, A., and Wade, R.C.** (2004). Determinants of functionality in the ubiquitin conjugating enzyme family. *Structure* 12, 1563-1574.
- Wong, C.W., and Privalsky, M.L.** (1998). Transcriptional silencing is defined by isoform- and heterodimer-specific interactions between nuclear hormone receptors and corepressors. *Mol Cell Biol* 18, 5724-5733.
- Wright, P.E., and Dyson, H.J. (2009). Linking folding and binding. *Curr Opin Struct Biol* 19, 31-38.
- Wu, Q., Lin, X.F., Ye, X.F., Zhang, B., Xie, Z., and Su, W.J.** (2004a). Ubiquitinated or sumoylated retinoic acid receptor alpha determines its characteristic and interacting model with retinoid X receptor alpha in gastric and breast cancer cells. *J Mol Endocrinol* 32, 595-613.
- Wu, R.C., Feng, Q., Lonard, D.M., and O'Malley, B.W.** (2007). SRC-3 coactivator functional lifetime is regulated by a phospho-dependent ubiquitin time clock. *Cell* 129, 1125-1140.
- Wu, R.C., Qin, J., Hashimoto, Y., Wong, J., Xu, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W.** (2002). Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by I kappa B kinase. *Mol Cell Biol* 22, 3549-3561.
- Wu, R.C., Qin, J., Yi, P., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W.** (2004b). Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways. *Mol Cell* 15, 937-949.
- Wu, R.C., Smith, C.L., and O'Malley, B.W.** (2005). Transcriptional regulation by steroid receptor coactivator phosphorylation. *Endocr Rev* 26, 393-399.
- Wurtz, J.M., Bourguet, W., Renaud, J.P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H.** (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol* 3, 206.
- Xing, H., Hong, Y., and Sarge, K.D.** (2010). PEST sequences mediate heat shock factor 2 turnover by interacting with the Cul3 subunit of the Cul3-RING ubiquitin ligase. *Cell Stress Chaperones* 15, 301-308.
- Xu, B., and Koenig, R.J.** (2004). An RNA-binding domain in the thyroid hormone receptor enhances transcriptional activation. *J Biol Chem* 279, 33051-33056.

- Xu, J., Wu, R.C., and O'Malley, B.W.** (2009a). Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. *Nat Rev Cancer* 9, 615-630.
- Xu, L., Wei, Y., Reboul, J., Vaglio, P., Shin, T.H., Vidal, M., Elledge, S.J., and Harper, J.W.** (2003). BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature* 425, 316-321.
- Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., and Peng, J.** (2009b). Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* 137, 133-145.
- Xu, Z., Kohli, E., Devlin, K.I., Bold, M., Nix, J.C., and Misra, S.** (2008). Interactions between the quality control ubiquitin ligase CHIP and ubiquitin conjugating enzymes. *BMC Struct Biol* 8, 26.
- Yan, F., Gao, X., Lonard, D.M., and Nawaz, Z.** (2003). Specific ubiquitin-conjugating enzymes promote degradation of specific nuclear receptor coactivators. *Mol Endocrinol* 17, 1315-1331.
- Yanagi, S., Shimbara, N., and Tamura, T.** (2000). Tissue and cell distribution of a mammalian proteasomal ATPase, MSS1, and its complex formation with the basal transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 568-573.
- Yao, T., and Cohen, R.E.** (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 419, 403-407.
- Yao, T.P., Ku, G., Zhou, N., Scully, R., and Livingston, D.M.** (1996). The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10626-10631.
- Yen, A., Roberson, M.S., and Varvayanis, S.** (1999). Retinoic acid selectively activates the ERK2 but not JNK/SAPK or p38 MAP kinases when inducing myeloid differentiation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35, 527-532.
- Yen, A., Roberson, M.S., Varvayanis, S., and Lee, A.T.** (1998). Retinoic acid induced mitogen-activated protein (MAP)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase-dependent MAP kinase activation needed to elicit HL-60 cell differentiation and growth arrest. *Cancer Res* 58, 3163-3172.
- Yi, P., Feng, Q., Amazit, L., Lonard, D.M., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W.** (2008). Atypical protein kinase C regulates dual pathways for degradation of the oncogenic coactivator SRC-3/AIB1. *Mol Cell* 29, 465-476.
- Yi, P., Wu, R.C., Sandquist, J., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., Means, A.R., and O'Malley, B.W.** (2005). Peptidyl-prolyl isomerase 1 (Pin1) serves as a coactivator of steroid receptor by regulating the activity of phosphorylated steroid receptor coactivator 3 (SRC-3/AIB1). *Mol Cell Biol* 25, 9687-9699.
- Yu, C., York, B., Wang, S., Feng, Q., Xu, J., and O'Malley, B.W.** (2007). An essential function of the SRC-3 coactivator in suppression of cytokine mRNA translation and inflammatory response. *Mol Cell* 25, 765-778.
- Yu, J., Li, Y., Ishizuka, T., Guenther, M.G., and Lazar, M.A.** (2003). A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. *EMBO J* 22, 3403-3410.
- Zamir, I., Harding, H.P., Atkins, G.B., Horlein, A., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., and Lazar, M.A.** (1996). A nuclear hormone receptor corepressor mediates transcriptional silencing by receptors with distinct repression domains. *Mol Cell Biol* 16, 5458-5465.
- Zamir, I., Zhang, J., and Lazar, M.A.** (1997). Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors. *Genes Dev* 11, 835-846.
- Zanotto-Filho, A., Cammarota, M., Gelain, D.P., Oliveira, R.B., Delgado-Canedo, A., Dalmolin, R.J., Pasquali, M.A., and Moreira, J.C.** (2008). Retinoic acid induces apoptosis by a non-classical mechanism of ERK1/2 activation. *Toxicol In Vitro* 22, 1205-1212.

- Zarrinpar, A., and Lim, W.A.** (2000). Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition. *Nat Struct Biol* 7, 611-613.
- Zechel, C., Shen, X.Q., Chambon, P., and Gronemeyer, H.** (1994a). Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements. *EMBO J* 13, 1414-1424.
- Zechel, C., Shen, X.Q., Chen, J.Y., Chen, Z.P., Chambon, P., and Gronemeyer, H.** (1994b). The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J* 13, 1425-1433.
- Zhang, F., Hu, Y., Huang, P., Toleman, C.A., Paterson, A.J., and Kudlow, J.E.** (2007). Proteasome function is regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase through phosphorylation of Rpt6. *J Biol Chem* 282, 22460-22471.
- Zhao, J., Zhang, Z., Vucetic, Z., Soprano, K.J., and Soprano, D.R.** (2009). HACE1: A novel repressor of RAR transcriptional activity. *J Cell Biochem* 107, 482-493.
- Zhao, X., Patton, J.R., Davis, S.L., Florence, B., Ames, S.J., and Spanjaard, R.A.** (2004). Regulation of nuclear receptor activity by a pseudouridine synthase through posttranscriptional modification of steroid receptor RNA activator. *Mol Cell* 15, 549-558.
- Zhao, X., Patton, J.R., Ghosh, S.K., Fischel-Ghodsian, N., Shen, L., and Spanjaard, R.A.** (2007). Pus3p- and Pus1p-dependent pseudouridylation of steroid receptor RNA activator controls a functional switch that regulates nuclear receptor signaling. *Mol Endocrinol* 21, 686-699.
- Zheng, N., Schulman, B.A., Song, L., Miller, J.J., Jeffrey, P.D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D.M., Elledge, S.J., Pagano, M., et al.** (2002). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 416, 703-709.
- Zhu, J., Gianni, M., Kopf, E., Honore, N., Chelbi-Alix, M., Koken, M., Quignon, F., Rochette-Egly, C., and de The, H.** (1999a). Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and oncogenic RARalpha fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14807-14812.
- Zhu, J., Koken, M.H., Quignon, F., Chelbi-Alix, M.K., Degos, L., Wang, Z.Y., Chen, Z., and de The, H.** (1997). Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3978-3983.
- Zhu, W.Y., Jones, C.S., Amin, S., Matsukuma, K., Haque, M., Vuligonda, V., Chandraratna, R.A., and De Luca, L.M.** (1999b). Retinoic acid increases tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 59, 85-90.
- Zhuang, M., Calabrese, M.F., Liu, J., Waddell, M.B., Nourse, A., Hammel, M., Miller, D.J., Walden, H., Duda, D.M., Seyedin, S.N., et al.** (2009). Structures of SPOP-substrate complexes: insights into molecular architectures of BTB-Cul3 ubiquitin ligases. *Mol Cell* 36, 39-50.
- Zimmerman, E.S., Schulman, B.A., and Zheng, N.** (2010). Structural assembly of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Curr Opin Struct Biol*.
- Zong, C., Young, G.W., Wang, Y., Lu, H., Deng, N., Drews, O., and Ping, P.** (2008). Two-dimensional electrophoresis-based characterization of post-translational modifications of mammalian 20S proteasome complexes. *Proteomics* 8, 5025-5037.